

T. C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VİROLOJİ (VET) ANABİLİM DALI
SABE PROJE NO:96/049

**GEBE SİĞİRLARDA VE BUNLARIN BUZAĞILARINDA
PERSİSTE BOVİNE VIRAL DIARRHEA VIRUS (BVDV)
ENFEKSİYONUNUN İMMUNFLORESANS VE
İMMUNPEROKSİDAZ TESTLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Orhan YAPKIÇ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Sibel YAVRU

88486

KONYA-1999

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZ SAVUNMA SINAV TUTANAĞI

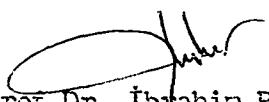
Öğrencinin	Adı Soyadı	Orhan YAPKIÇ
	Numarası	93434501
Anabilim/Bilim Dalı		VİROLOJİ (VET.)
Fakültesi		VETERİNER Fakültesi
Sınavın	Tarihi	16.04.1999
	Günü	Cuma
	Süresi	Bir saat
KARAR		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Düzeltme <input type="checkbox"/> Red (*)
<input checked="" type="checkbox"/> Oybirliği <input type="checkbox"/> Salt çoğunluk		

Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Öğretim ve Sınav Yönetmeliği hükümleri uyarınca yapılan Doktora Tez Savunma Sınavı gerçekleştirilmiş ve adayın durumu bu tutanakla tespit edilmiştir.


Prof. Dr. Feridun ÖZTÜRK
 Üye
 Öğretim Üyesi


Prof. Dr. Hüdaverdi ERER
 Üye
 Öğretim Üyesi


Doç. Dr. Sibel YAVRU
 Üye
 Öğretim Üyesi
 (Danışman)


Prof. Dr. İbrahim BURGU
 Üye
 Öğretim Üyesi


Prof. Dr. Mehmet ATEŞ
 Üye
 Öğretim Üyesi

Madde 28-b) Jüri üyeleri sözkonusu tezin kendilerine teslim edildiği tarihten itibaren en geç iki ay içinde toplanıp tezle ilgili kişisel raporları incelerler. Tezin savunulabilir bulunması durumunda öğrenci, 45-90 dakika süreli olarak sınava alınır. Tez sınavı tez çalışmasının sözlü olarak sunulması ve bunu izleyen soru-cevap bölümünden oluşur.

c) Tez sınavının tamamlanmasından sonra jüri, tez hakkında salt çoğunlukla "Kabul", "Red" veya "Düzeltme" kararı verir. Bu karar, enstitü anabilim dalı başkanlığında tez sınavını izleyen üç gün içinde enstitüye tutanakla bildirilir.

d) Tezi reddedilen öğrencinin yükseköğretim kurumuyla ilişiği kesilir. Tezi hakkında düzeltme kararı verilen öğrenci en geç altı ay içinde gereğini yaparak tezini aynı jüri önünde yeniden savunur. Bu savunma sonunda da tezi kabul edilmeyen öğrencinin yükseköğretim kurumu ile ilişiği kesilir.

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ.....	2
2. LİTERATÜR BİLGİ.....	3
2.1. Etiyoloji.....	7
2.2. Epidemiyoloji.....	8
2.3. Patogenez.....	11
2.3.1 ncp BVDV ile Enfeksiyonun Patogenezi.....	11
2.3.2. Uterus İçi Enfeksiyonun Patogenezi.....	12
2.3.3. Mukozal Diseaseenin Patogenezi.....	14
2.4. Klinik.....	15
2.4.1. Virulent noncytopathogen BVDV kliniği.....	17
2.5. Teşhis.....	17
2.5. 1. Direkt teşhis.....	18
2.5.2. İndirekt teşhis	19
2.6. İmmunoloji.....	20
3.MATERIAL VE METOT.....	23
3.1. Virus.....	23
3.2.Hücre Kültürü.....	23
3.3. Konjugatlar.....	23
3.4. Dana Serumu.....	23
3.5. Virus İzolasyon Materyalleri	24
3.6. Serum Numuneleri.....	24
3.7. Virusların Üretilmesi.....	24
3.8. Virusların Titrasyonu.....	25
3.9. Hücre Kültürüünün Hazırlanması.....	25
3.10. Lökosit Örneklerinden Virus İzolasyonu.....	26
3.11. Konjugatların Titrelerinin Hesaplanması.....	27
3.12. Direkt İmmunfloresans (DIF)Testi.....	27
3.13. Direkt İmmunperoksidaz (DPLA) Testi.....	28
3.14. Serolojik Testler.....	28
3.14.1. Serum Nötralizasyon (SN) Testi.....	28
3.14.2. Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon ₅₀ (SN ₅₀) Testi	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. Virusların Üretilmesi.....	30
4.2. Virusların Titresi.....	30
4.3. Konjugatların Titresi.....	30
4.4. Direkt İmmunfloresans (DIF) Testi Sonuçları.....	30
4.5. Direkt İmmunperoksidaz (DPLA) Testi Sonuçları.....	31
4.6. Serum Nötralizasyon Testi Sonuçları	31
4.7. Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon ₅₀ (SN ₅₀) Testi Sonuçları.....	31
5. TARTIŞMAVE SONUÇ.....	40
6. ÖZET.....	49
7. SUMMARY	50
8. KAYNAKLAR	51
9. ÖZGEÇMİŞ	67
10. TEŞEKKÜR	68

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Fötal Dana Böbrek (FDB) hücre kültürü kontrol (X40).....	32
Resim 2. BVDV NADL suşunun FDB hücre kültüründe 1. günde meydana getirdiği CPE (X100).....	32
Resim 3. BVDV NADL suşunun FDB hücre kültüründe 3. günde meydana getirdiği CPE (X100).....	33
Resim 4. Floresan mikroskopta BVDV 0712 suşu virus kontrol (X200).....	33
Resim 5. İmmunperoksidaz testinde BVDV 0712 suşu virus kontrol (X200).....	34



TABLO VE GRAFİK LİSTESİ

Tablo 1. Örneklenen gebe hayvanların ve buzağılarının serum nötralizasyon testi sonucu tespit edilen SN ₅₀ değerleri.....	35
Tablo 2. Örneklenen hayvanlardan seropozitif bulunan prekolostral buzağıların doğum anı ve ortalama 3 ay içindeki SN ₅₀ titreleri.....	36
Tablo 3. Doğum Anında Seropozitif Bulunan Buzağıların Ortalama 3 ay İçindeki Örnekleme Zamanları.....	36
Tablo 4. Doğum Anında Seronegatif Bulunan Buzağıların Ortalama 3 ay İçindeki Örnekleme Zamanları	37
Grafik 1. Doğumdan önce (Anne 1) ve doğum anında (Anne 2) örneklenen gebe ineklerin SN ₅₀ değerleri.....	38
Grafik 2. Buzağıların prekolostral (Yavru 1) ve doğumdan sonra ortalama 3 ay içinde (Yavru 2) örneklenen kan serumlarının SN ₅₀ değerleri.....	39

KISALTMALAR:

AGID	:	Agar Gel Immunodiffuzyon
BVD	:	Bovine Virus Diarrhea
BVDV	:	Bovine Virus Diarrhea Virus
°C	:	Santigrat
CCSC	:	Cell Culture Staining Chamber
CFT	:	Complement Fixation Test
cp	:	Cytopathogen
CPE	:	Cytopathologic Effect
DIFT	:	Direct Immunflourescence Test
dk	:	Dakika
DKID ₅₀	:	Doku Kültürü Enfeksiyöz Doz %50
DMSO	:	Dimethylsulphoxide
DPLA	:	Direct Immunperoxidase Linked Antibody Assay
EDTA	:	Ethylendiamine Tetraaceticacid
ELA	:	Earle's Lactalbumin
ELISA	:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EM	:	Elektron Mikroskobi
FDB	:	Fötal Dana Böbrek
FDS	:	Fötal Dana Serum
FITC	:	Flourescein Isothiocyanate
ID	:	Immundiffusion
IF	:	Immunfloresan
Ig	:	Immunglobulin

IUGR	:	Intrauterine Growth Retardation
kb	:	Kilobase
kD	:	Kilodalton
Log	:	Logaritma
μl	:	Mikrolitre
$\text{m}\mu$:	Milimikron
M	:	Molar
MD	:	Mucosal Disease
MDBK	:	Madine Darby Bovine Kidney
MEM	:	Minimal Essential Medium
ml	:	Millilitre
NADL	:	National Animal Disease Laboratory
ncp	:	Noncytopathogen
nm	:	Nanometre
NPLA	:	Neutralisation Peroxidase Linked Antibody Assay
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PI	:	Persiste enfeksiyon
PTA	:	Serum Neutralisation
UA	:	Uranyl Acetate

1. GİRİŞ

Bovine Viral Diare Mucosal Disease (BVD-MD) tüm dünyada sığırlar arasında yaygın bir enfeksiyondur. Sığır yetiştirciliğinde oluşturduğu ekonomik kayıplarla önemini ve güncelliğini korumaktadır (Radostits ve Littlejohns 1988, Grooms ve ark. 1998).

Seronegatif gebe anneler gebelikleri boyunca virusu transplasental olarak fötuslarına aktarabilmektedir. Anne karnında bulunan enfekte olan fötus, yaşına bağlı olarak, ya immun sistemi virusa karşı uyarılarak antikor oluşturabilmekte ya da immun sistemi virusa karşı antikor oluşturamadığından virusu yabancı olarak tanıtmamaktadır. Bunun sonucunda virusla enfekte olarak doğan buzağılar hayatı boyunca çevreye virus saçmaktadır ve enfeksiyon kaynağı olarak kabul edilmektedirler (Schultz 1973, Duffell ve Harkness 1985, Baker 1987, Deregt ve Loewen 1995, Thur ve ark. 1997).

Bovine Viral Diare Virus (BVDV)'undan etkilenen gebe ineklerin fötuslarında abort (Thur ve ark. 1997) ve fotal ölümler (Brownlie ve ark. 1998) oluşabileceği gibi fotal bozukluklarda şekillenebilmektedir. Fotal gelişim bozuklukları arasında konjenital anomaliler (Casaro ve ark. 1971, Kahrs ve ark. 1980, Roeder ve ark. 1986, Brownlie ve ark. 1998), fotal ölüm ve mumifikasyon (Liess 1990, Moermann ve ark. 1994, Weiss ve ark. 1994), persiste enfekte buzağı doğum (Liess 1985, Moening 1990, Bruschke ve ark. 1998) sayılabilir.

Fötus, gebeliğin 120. gününden sonra BVDV'u tarafından enfekte edilmiş ise immun sistemi yanıt oluşturma yeteneğine sahip olduğundan virusa karşı antikor şekillendirebilmekte ve seropozitif olarak doğmaktadır (Kendrick 1971, Casaro ve ark. 1971, Brown ve ark. 1979, Liess ve ark. 1984).

Seronegatif ineklerin gebeliklerinin erken dönemlerinde BVDV'undan etkilenmeleri sonucu persiste enfekte doğan buzağıların BVDV'ü ile tekrar enfekte olmaları ile öldürücü Mukozal Disease (MD) şekillenebilmektedir (Brownlie 1990, Moenning 1990, Liebler-Tenorro ve ark. 1997).

Bu araştırmada, özel bir işletmede bulunan gebe ineklerin BVDV'ü ile olabilecek doğal bir enfeksiyonu sonucu, fötusta gelişebilecek fotal lezyonlarla birlikte gebe ineklerin doğum öncesi ve doğum anında, prekolostral buzağıların ve kolostrum almış buzağıların virusa karşı antikor varlığı ve virus yönünden araştırılmalarının yanında BVDV'unu ve BVDV'una karşı gelişen antikor varlığını tespit etmek için uygulanan testlerle persiste enfeksiyonları belirlemek ve varsa böyle hayvanların sürüden uzaklaştırılmasını tavsiye etmek amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİ

Bovine Viral Diare Virus (BVDV) enfeksiyonu bütün dünyada sığır yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplar oluşturan nedenlerden en önemli olarak karşımıza çıkmaktadır. İnfertilite, erken embriyonik ölümler ve mumifikasyon, abort ve konjenital anomaliler ve persiste enfekte buzağı doğumları BVDV' u ile enfeksiyondan sonra oluşabilecek olgulardır (Moenning 1990, Grooms ve ark. 1998).

BVDV' u ilk kez 1946 yılında Olafson ve ark. (1946) tarafından akut enterik ve klinik semptom olarak ateş, iştahsızlık, öksürük ve diyare ile karakterize ettiğleri bir hastalık etkeni olarak tespit edilmiş ve "Bovine Virus Diarrhea" (BVD) olarak tanımlanmıştır. Malmquist (1968), Childs tarafından 1946 yılında Kanada'da tespit edilen hastalığa "X disease" adı verildiğini ifade etmiştir. Ramsey ve Chivers (1953), benzer semptomlar gösteren ama özellikle sindirim sisteminde lokalize olan bir hastalık daha tespit etmişler ve hastalığı "Mucosal Disease" (MD) olarak tanımlamışlardır. Daha sonra bu iki hastalığın da aynı etken tarafından oluşturulduğu anlaşılmış ve hastalığa Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease (BVD-MD) adı verilmiştir (Malmquist 1968, Horzinek 1990).

Duyarlı gebe hayvanlar BVDV'una maruz kaldılarında, virusu rahatlıkla fötusa ileterler (Straver ve ark. 1983, Liess 1985, Baker 1987, Moenning 1990). Etkenin fötusa etkisi hayvanın gebelik dönemine bağlı olarak değişmektedir (Moenning 1990). Fötuslar BVDV'una yaklaşık 90-120. günde immun cevap oluşturabilirler. Bu yüzden BVDV' u ile enfeksiyonda fötusun immunolojik durumu çok önemlidir. Fötal hayattaki ilk enfeksiyonlar bir çok doku ya da organda persiste enfeksiyonların gelişmesine ve hayatları boyunca enfekte kalan buzağıların doğumuna liderlik ederler. Bu durum fötusun viral antijenlere karşı immun cevap oluşturamamasından kaynaklanmaktadır. Fötus immun cevap oluşturmadığından buzağı doğduğunda vírusa karşı antikor taşımaz yani seronegatif olarak doğar. Persiste enfekte olarak adlandırılan bu buzağılar vírusu sürekli olarak etrafa saçarlar ve sürü içinde hastalığın yayılmasında etkili olurlar. Bu hayvanlar MD' in gelişmesinde büyük riske sahiptirler (Schultz 1973, Duffell ve Harknes 1985, Baker 1987, Brownlie ve ark. 1987, Moenning 1990, Deregt ve Loewen 1995, Thur ve ark. 1997).

Schultz (1973), Kahrs ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada BVDV' unun yoğun olarak gözlendiği bir sürüde abort olmuş fötuslar ve emzirmeden önce numune alınan 14 buzağıdan 8 tanesinde vírusa karşı nötralizan antikor tespit ettiğini ifade etmiştir.

BVDV' u ile enfekte gebe sığırlardaki virusun fótusa geçişyle oluşan fótal enfeksiyonlar; konjenital anomaliler (Casaro ve ark. 1971, Kahrs ve ark. 1980, Duffell ve Harknes 1985, Roeder ve ark. 1986, Baker 1987, Brownlie ve ark. 1998), abort (Casaro ve ark. 1971, Kahrs ve ark. 1980, Duffell ve Harknes 1985, Baker 1987, Moenning 1990, Thur ve ark. 1997, Brownlie ve ark. 1998), fótal mumifikasyon (Baker 1987, Liess 1990, Moerman ve ark. 1994, Weiss ve ark. 1994, Brownlie ve ark. 1998), persiste enfekte buzağı doğum (Liess 1985, Liess 1990, Moenning 1990, Moerman ve ark. 1994, Weiss ve ark. 1994, Bruschke ve ark. 1998), beyin ve göz lezyonları (Straver ve ark. 1983, Hewicker-Trautwein ve Trautwein 1994, Hewicker-Trautwein ve ark. 1995, Hewicker-Trautwein ve ark. 1995) olarak belirlenmiştir.

BVDV' u sığır solunum sistemi hastalıklarında önemli komplikasyonlara neden olabilmektedir (Baker 1987). Reet ve Adair (1997), genç buzağılarda görülen yaygın solunum sistemi enfeksiyonlarında BVDV'unun sık olarak izole edildiğini ifade etmektedir. BVDV' u immunsupresif etkisine bağlı olarak solunum kanalında enfeksiyonun olması için predispoze bir rol üstlenmektedir (Horzinek 1990, Reet ve Adair 1997). Potgieter (1997), Reggiardo'nun, Texas'taki besi ineklerinin pneumonili akciğerlerinden sık olarak BVDV' u izole ettiğini bildirmiştir. BVDV aynı zamanda diğer solunum sistemi patojenleriyle de sinerjizm oluşturmaktadır (Reet ve Adair 1997). Baker (1987) BVDV' u ile Pasteurella haemolytica arasında sinerjik bir etkinin olduğunu ifade etmiştir. BVDV'unun cp biyotipi ile oluşan solunum sistemi enfeksiyonları, ncP 'biyotipi ile oluşanandan daha ağır seyretmektedir (Baker 1987, Moenning 1990, Potgieter 1997).

Türkiye'de BVD-MD enfeksiyonunun varlığı ilk kez 1964 yılında Öncül ve ark. (1964), tarafından kültür ırkı ineklerde gözlenen klinik bulgulara dayanılarak ortaya konmuştur.

Ülkemizde daha sonra yapılan çalışmalarında Finci (1972), Doğu ve Orta Anadolu bölgelerindeki 2360 sığırın serumlarında %9,6 oranında BVDV antikoru tespit etmiş, 2 adet kan örneği ve 1 adet ovidukt içeriğinden yaptığı örneklemelerle primer dana böbrek ve sekonder dana testis hücre kültürlerinde virus izole ettiğini bildirmiştir.

Alkan (1993), yaptığı bir çalışmada 639 sığır serumunu BVDV' u antikorları yönünden incelemiştir ve bu serumların 203 adedinde (%31,7) seropozitiflik saptamıştır. Aynı çalışmada araştırıcı (1993) konjenital anomalili doğan buzağıların annelerinden BVDV' u izole ettiğini ve BVDV' un konjenital anomalili buzağı doğumlarında etkili olabileceğini bildirmiştir.

Gelferd (1991), Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgesinde yaptığı çalışmada BVDV'a karşı %18-100 arasında değişen oranlarda seropozitiflik elde ettiğini ve bu serumlardan bir tanesinde BVDV antijeni saptadığını belirtmiştir.

BVDV'u plasentayı geçerek fötusu enfekte edebilir ve fötusun yaşına bağlı olarak fotal ölüme veya çeşitli fotal bozukluklara veya persiste enfekte buzağıların doğumuna neden olabilir (Kobrak ve Weber 1997).

Perdrizet ve ark. (1987), gebe inekler üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada gebelik süresinin ilk 1/3'ünde bulunan gebe inekleri BVDV'u ile intrauterin olarak enfekte ederek sonuçlarını gözlemeşler ve reproduktif bozuklukları tespit etmişlerdir.

Thur ve ark. (1998), 1992-1994 yılları arasında doğumdan sonra ölen ve abort olmuş 213 adet sığır fötusunu BVDV'u yönünden incelemiştir. İndirekt ELISA testine tabi tutulan kan serumlarının %6'sında BVDV'una karşı antikor tespit etmişlerdir. İncelenen fötusların 9 tanesinden direkt ELISA testi ve immunhistokimyasal boyamalarla ve hücre kültürlerinde BVDV'unu izole ettiklerini bildirmiştir.

Munoz ve ark. (1996), 52 adet fötusun çeşitli organlarından hazırladıkları süspansiyonları primer dana testis hücre kültürlerine inocule ederek BVDV'unun sitopatojen (cp) ve nonsitopatojen (ncp) biyotiplerini indirekt immunfluoresans testi ile araştırmışlardır. Araştırcılar (1996), 52 fötusun 11 tanesinin en az bir organında (%21.2) ncp BVDV'unu, 10 dalaktan 6 tanesinde, 7 böbrekten 4 tanesinde, 9 akciğerden 7 tanesinde ve 5 karaciğerden 3 tanesinden cp BVDV'unu izole ettiklerini bildirmiştir.

Casaro ve ark. (1971), BVDV'unun gebe inekler üzerindeki etkisini gözlemek üzere yaptıkları çalışmada, gebeliğinin 51-99. günlerinde bulunan 5 adet ineği intrauterin olarak BVDV'u ile enfekte etmişlerdir. Virus inoculasyonunu takiben 10-21 gün içinde 5 fötusun hepsinin olduğunu ve bu durumun BVDV'unun intrauterin enfeksiyonunun bir sonucu olduğunu bildirmiştir.

Kendrick (1971), 23 adet ineği BVDV'u ile intramuskuler olarak enfekte etmiş. Gebeliğin ilk 1/3'lük dönemindeki 9 adet ineğin buzağılarının 3 tanesinin abort, 1 tanesinin mumifiye fötus, 1 tanesinin kısmi alopsiya, 3 tanesinin normal ve 1 tanesinin de ölü doğumla sonuçlandığını; gebeliğin 2. ve 3. 1/3'lük dönemindeki ineklerin ise normal buzağı doğumunu yaptığıni bildirmiştir.

Liess ve ark. (1987), gebeliğinin 90-120. günlerinde bulunan ineklere yaptıkları canlı virus aşılamları sonucunda canlı doğan buzağılardan 2'sinin persiste enfekte olduğunu. 5'inde merkezi sinir sistemi semptomları gözlediğini ve ayrıca 2 abort vakası tespit ettiklerini bildirmiştir.

Gillespe ve ark. (1967), abort olmuş iki fötusun akciğer, karaciğer, dalak, barsak, böbrek ve beyinlerinden hazırladıkları doku süspansiyonlarını fötal dana böbrek hücre kültürlerine inokule ederek BVDV'unun ncp iki türünü izole ettiklerini belirtmişlerdir.

Braun ve ark. (1971), çeşitli yaşlarda bulunan 12 adet Holstein-Friesian ırkı ineği gebeliklerinin 100-235. günlerinde BVDV'unun NADL suşu ile enfekte etmişlerdir. 2 adet sığırların kesimi sonucu, sezeryan ile de 10 adet olmak üzere toplam 12 adet fötus elde ederek bunların beyin, akciğer, plasenta, dalak, allantoik ve amniotik sıvılarından hazırladıkları homojenatları kemik iliği hücre kültürüne inokule ederek BVDV'unu izole ettiklerini açıklamışlardır.

Brownlie ve ark. (1986), 46 adet gebe sığırı gebeliklerinin 110.gündünden sonra ncp BVDV'u ile intrauterin olarak enfekte ettiklerini, gebe hayvanlarının 9 tanesinin abort, 4 tanesinin ölü doğum yaptığını, canlı doğan buzağılardan 12 tanesinin sağlıklı olduğunu, 4 tanesinin klinik semptomlar gösterdiğini, 17 tanesinin de viremik olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar (1986), çalışmalarının sonucunda fötusun 120. günden sonra da virustan etkilenebileceğini, ancak 120. günden daha önce yapılan inokulasyonlarla immun cevap oluşturulmadığından persiste enfekte buzağıların doğabileceğini vurgulamışlardır.

Coria ve ark. (1983), yaptıkları bir çalışmada gebeliklerinin erken dönemlerinde bulunan 12 adet inek seçiklerini, bunlardan seronegatif olan 6 ineğin (49-84. gün) BVDV'u ile intravenöz olarak, seropozitif olan 6 ineğin (58-125. gün) ise aynı virusla laparatomı yoluyla direkt olarak fötuslarını enfekte ettiklerini bildirmişlerdir. Doğan buzağıların 11 tanesinden ncp BVDV'unu izole ettiklerini bildirmişlerdir, buzağılardan kolostrum almadan önce IgG₁, IgG₂ ve IgM belirleyemediklerini, kolostrum aldıktan sonra ise sırayla 1. ayda IgG₂'yi, 2. ayda IgG₁'i tespit ettiklerini ancak IgM'yi ise 3. ayın sonuna kadar tespit edemediklerini belirtmişlerdir. Araştırmacılar (1983), buzağılardan elde ettikleri IgG₁'in titresini 11,1 mg/ml, IgG₂'nin titresini 0,8 mg/ml, IgM'nin titresini ise 0,9 mg/ml olarak belirlediklerini ifade etmişlerdir.

Coulibaly ve ark.(1986), gebeliklerinin 50-265. günleri arasında aşılanan analardan doğan buzağılara ait kan serumu örneklerini IgG yönünden incelediklerini belirtmişlerdir. Çalışmanın sonucunda BVDV'una karşı virolojik açıdan negatif, serolojik açıdan pozitif olan 44 buzağıda IgG₁ miktarını 106,36 mg/ 100 ml, IgG₂ miktarını 10,49mg/ 100 ml; serolojik ve virolojik açıdan negatif 27 buzağıda Ig G₁ miktarını 18,47 mg/ 100 ml, IgG₂ miktarını 6,63 mg/ 100 ml ve virolojik açıdan pozitif, serolojik açıdan negatif 10 buzağıda IgG₁ miktarını 34,78 mg/ 100 ml, IgG₂ miktarını ise 8,34 mg/ 100 ml olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

2.1. Etiyoloji

BVDV'u, Flaviviridae familyasının pestivirus alt grubunda yer alır (Hewicker-Trautwein ve Trautwein 1994, Bruschke ve ark. 1996, Potgieter 1997, Liebler-Tenorio ve ark. 1997). Etken, Avrupa domuz vebası ve koyunların Border Disease virusu ile antijenik yakınlık gösterir. Etken en küçük RNA viruslarındanandır. RNA tek iplikçiklidir ve 12,5 kb moleküler ağırlığa sahiptir (Collett ve ark. 1989, Horzinek 1990, Bruschke ve ark 1996, Laamanen ve ark. 1997).

BVDV'unun klasik türleri, 2 genotipe ayrılmaktadır. 1. genotip (tip 1) aşılı viruslarını oluşturur ve immunkompetans hayvanlarda orta şiddetle enfeksiyon meydana getirir. 2. genotip (tip 2) ise trombosit azalması ile seyreden akut BVDV enfeksiyonlarını meydana getirir (Deregt ve Prins 1998). BVDV-1 ve BVDV-2'nin hücre kültürlerinde gözlenebilen patolojik bozuklukları oluşturan cp biyotipi ve hücre kültürlerinde patolojik bozuklukları gözlenmeden çoğalan ncp biyotipi olmak üzere ikişer biyotipi de mevcuttur (Castrucci ve ark. 1991, Hewicker-Trautwein ve ark. 1992, Brock ve ark. 1993, Liebler-Tenorio ve ark. 1997).

Hafez ve Liess (1972), BVDV'unun eter, kloroform, tripsin ve ısiya hassas olduğunu 1 M Magnesium chlorure-2'nin varlığında virusun ısiya hassasiyetinin arttığını bildirmiştir. Ayrıca araştırmacılar (1972), virusun pH 5,7-9,3 arasında stabil olduğunu belirtmişlerdir.

Fernelius (1968), BVDV'nun hem cp hem de ncp biyotiplerinin 100-220 milimikron (μm) milipor filtrelerden geçtiğini bildirmiştir.

Hafez ve ark. (1968), BVDV'nu phosphotungstic asit (PTA) ya da uranyl acetate (UA) ile boyandıktan sonra, elektron mikroskopla yaptıkları değişik teknik çalışmalarla BVDV partiküllerinin çaplarını 46 (+/- 16) nm, 50 (+/-20) nm ve 60 (+/-26) nm olarak tespit etmişlerdir.

BVDV biyotiplerinin viral polipeptitleri arasında farklılıklar belirtilmiştir. cp-BVDV izolatları viral polipeptidlerden p80 ve p125'i içerirken, ncp BVDV sadece p125'i içermektedir. Bunların dışında p125 ile genetik ilişkili olup p80 ile ilişkisi olmayan 54 kilodalton (kD) proteini identifiye edilmiş, p80 ve 54 kD proteinin viral replikasyon süresince parçalanan p125'ten köken aldığı belirtilmektedir (Horzinek 1990, Moenning 1990, Deregt ve Loewen 1995).

Araştırmacılar, BVDV'unun primer hücre kültürlerinden fötal dana böbrek (Gillespe ve ark. 1967, Hafez ve ark. 1976, Orban ve ark. 1983, Hyera ve ark. 1985, Burgu ve ark. 1990, Depner ve ark. 1991, Alkan ve Burgu 1993, Kommisrud ve ark. 1996, Jian ve ark. 1997, Frey ve ark. 1998), fötal dana testis (Hafez ve Liess 1972, Bezek ve ark. 1994, David ve ark. 1994), fötal dana kas (Shimizu ve ark. 1989), fötal dana deri (Straver ve ark. 1983), fötal dana akciğer (Howard ve ark. 1986, Meyling ve Mikél Jensen 1988), testis (Malmquist 1968, Jensen ve ark. 1990, Holand ve ark. 1993, Nakajima ve ark. 1993), dalak (Malmquist 1968), trachea (Malmquist 1968), endokardiyum (Archbald ve ark. 1973, Archbald ve Zemjanis 1977), türbinata (Bolin ve ark. 1985, Bolin ve ark. 1985, Liess 1985, Mc Clurkin ve ark. 1985, Carlsson 1997) ve devamlı hücre kültürlerinden Madine Darby Bovine Kidney (MDBK) (Ohmann 1983, Ohmann ve ark. 1987, Magar ve ark. 1988, Ohmann 1988, Moenning ve ark. 1990, Pellerin ve ark. 1994), Pig Kidney (PK)15 (Xue ve ark. 1996) hücre kültürlerinde çoğaltılabildiğini ifade etmişlerdir.

2.2. Epidemiyoloji

BVDV'unun epidemiyolojisinde durulması gereken en önemli olguların başında fötal enfeksiyonlar ve persiste buzağı doğumları gelmektedir. Persiste enfekte hayvanlar çiftleşebilirler ve buzağlarına enfeksiyonu aktarabilirler (Meyling ve ark. 1990). Virus enfekte hayvanlardan nazal akıntı (Johnson ve Muscoplat 1973, Castrucci ve ark. 1991, Potgieter 1997), semen (Kahrs ve ark. 1980, Meyling ve ark. 1990, Kirkland ve ark. 1991, Kommisrud ve ark. 1996), idrar (Brownlie ve ark. 1987), gaita (Olafson ve ark. 1946, Johnson ve Muscoplat 1973), gözyaşı akıntısı (Cutlip ve ark. 1980, Meyling ve ark. 1990), kan (Bolin ve ark. 1985, Frey ve ark. 1991, Houe ve Meyling 1991) ve süt (Fredriksen ve ark. 1998) ile çevreye saçılmaktadır.

Virus ayrıca embriyo transferi (Meyling ve ark. 1990, Wentink ve ark. 1991), kontamine aşilar (Meyling ve ark. 1990, Houe 1995), kan emici sinekler (Tarry ve ark. 1991, Gunn 1993), fötal membranlar (Braun ve ark. 1971, Duffell ve Harkness 1985, Rokos ve ark. 1998, Taylor ve ark. 1995), persiste viremik hayvanlar (Houe 1995, Liebler-Tenorio ve ark. 1997, Taylor ve ark. 1997, Brock ve ark. 1998, Hamers ve ark. 1998) ve sıçır dışındaki ruminantların (Loken ve ark. 1991, Bruschke ve ark. 1996, Vilcek ve ark. 1997) vasıtası ile de saçılabilmektedir.

Alenius ve ark. (1986), İsveç'te yaptıkları bir çalışmada BVDV'unun varlığını ortaya koymak için 711 adet düveden topladıkları kan numunelerini serolojik ve virolojik yönden incelemiştirlerdir. Araştırmacılar (1986), topladıkları serumların %41'inde BVDV'una karşı seropozitiflik tespit ettiklerini, 9 adet düveden ise BVDV'unun ncp biyotipini belirlemeyi başarak persiste enfekte düve oranını %1,3 olarak belirlediklerini bildirmiştirlerdir.

Shimizu ve Satou (1987), Japonya'nın farklı bölgelerinde bulunan ve konjenital anomali gözlenen, 154 adet buzağıdan topladıkları kan serumlarını persiste BVD-MD enfeksiyonu yönünden incelemiştir ve 18 adet buzağıdan ncp BVDV'unu izole ettiklerini bildirmiştirlerdir. Araştırmmanın devamında aynı hayvanlardan 2 ay sonra alınan ikinci kan serumu örneklerinden 12'sinde ncp BVDV'unu tekrar izole ederek buzağların persiste enfekte olduğunu ve bu buzağılardan elde edilen serumlarda nötralizan antikorlara rastlamadıklarını ifade etmişlerdir.

Gebeliğin 120. gününden önce BVDV'unun ncp biyotipi ile enfekte olan gebe inekler etkeni transplasental olarak fötuslarına aktarabilirler. Bu dönemde immun sistemi tam olarak gelişmeyen fötus, etkeni抗原 olarak kabul etmeyerek, herhangi bir immun cevap oluşturamaz ve virusla birlikte persiste enfekte olarak dünyaya gelir (Baker 1987, Brownlie ve ark. 1987, Moenning 1990, Deregt ve Loewen 1995, Thur ve ark. 1997).

BVDV enfeksiyonunda virusun ineklerde lenfosit ve nötrofil fonksiyonunu bozduğu, immunsupresyon oluşturuğu ve BVDV'unun diğer etkileri ile birlikte seyrettiği durumlarda klinik bulguların şiddetinin arttığı bildirilmektedir (Radostits ve Littlejohns 1988, Potgieter 1997).

BVDV'unun, ilk olarak sindirim sistemine ilgi gösterse de, lenforetiküler dokulara yüksek oranlarda affinite gösterdiği, enfeksiyondan sonra nekroz odaklarında, lenf düğümlerinde ve dalakta tespit edildiği ifade edilmiştir (Baker 1987). Virus generalize bir enfeksiyon oluşturmasından dolayı diğer bir çok organda da bulunabilir ve idrar, salya, gözyaşı, semen gibi vücut sıvılarıyla sürekli olarak çevreye saçılabilir (Straver ve ark. 1983, Radostits ve Littlejohns 1988).

Embriyo transferi, BVDV'unun yayılmasında etkili faktörlerden sadece biridir. Embriyo transferinde kullanılan yıkama sıvılarının BVDV'u ile kontamine olması virusun embriyolara aktarılmasında ve yayılmasında etkin bir yoldur (Meyling ve ark. 1990). Ayrıca embryo transferi için seçilen hayvanların daha önce BVDV'u ile kontamine olmaları olasıdır. Bu yüzden BVDV enfeksiyonlarının yayılmasını engellenmesi için alıcı pozisyondaki hayvanların özgeçmişlerinin bilinmesi önem taşımaktadır (Meyling ve ark.

1990). Enfekte böğalar ve sperma BVDV'nun yayılımında etkin rol oynamaktadır. (Kirkland ve ark. 1991, Kommisrud ve ark. 1996).

Kommisrud ve ark. (1996), yaptıkları bir çalışmada akut olarak enfekte edilmiş böğaların spermalarında virusun varlığını araştırmışlardır. Bu amaçla 6 adet boğayı BVDV'unun cp biyotipi ile intravenöz olarak enfekte ettilerini, 4 adet boğayı ise kontrol olarak bıraktıklarını ve inoculasyonu takiben 22. günde inocule edilen bütün hayvanları BVDV'u yönünden seropozitif bulduklarını ifade etmişlerdir.

Kirkland ve ark. (1991), 5 adet boğayı BVDV'ü ile intranasal olarak enfekte etmişler ve inoculasyonu takiben 14 günlük bir sürede enfekte edilen böğaların 3'ünden alınan sppermadan virusu izole etmeyi başarmışlardır.

Tarry ve ark. (1991), yaptıkları bir çalışmada BVDV'unun naklinde kan emici sinek türlerinin (*Stomoxys calcitrans*, *Haematopota pluvialis* ve *Hydrotaea irritans*) rolü olup olmadığını deneysel olarak araştırdıklarını bildirmiştir. Bu amaçla seçikleri kan emici sinek türlerini BVDV'ü ile persiste enfekte bir boğanın bulunduğu kapalı ortamda uçuşturarak araştırmacılar daha sonra sinekleri hem antikor hem de virus yönünden negatif olan hayvanlarla bir arada tuttuklarını ve takip eden 5-10 gün içinde virusu izole etmeyi başardıklarını bildirmiştir.

Bolin ve ark. (1985), 9 adet persiste enfekte boğayı (ncp BVDV izole edilmiş) BVDV'unun cp biyotipi ile aşılamaya tabi tutarak bir süperenfeksiyon oluşturduklarını ve hayvanlarda MD enfeksiyonu belirlediklerini ifade etmişlerdir. Araştırcılar (1985), hazırladıkları aşılama programında 9 adet boğayı 3'lü gruplara böldüklerini, ilk iki gruba canlı modifiye BVDV aşısı, 3.gruba ise ölü aşısı uyguladıklarını, canlı virusla aşılanan hayvanlarda BVDV'una karşı yüksek düzeyde antikor belirlerken, ölü virusla aşılanan hayvanlarda daha düşük düzeyde antikor tespit ettilerini ancak tüm korumalara rağmen hayvanların yine de persiste enfekte kaldıklarını bildirmiştir.

Canlı virus aşları ile gebeliğin erken dönemlerinde aşılanan hayvanlarda virus plasentayı geçerek fötusu etkileyebilmektedir (Baker 1987).

BVDV'u sığırlar dışında diğer ruminantlarda da belirlenmiştir (Loken ve ark. 1991, Campen ve ark. 1997, Elazhary ve ark. 1984).

Elazhary ve ark. (1984), BVDV'unun koyun ve keçilerdeki varlığını ortaya koymak için 1075 adet klinik olarak normal gözüken koyun ve keçiden topladıkları serum numunelerini indirekt floresans testi ile kontrol etmişler ve serumlardaki antikor varlığını %22.2 oranında tespit ettilerini bildirmiştir.

Depner ve ark. (1991), yaptıkları deneysel bir çalışmada, 18 adet keçiyi gebeliklerinin 78. gününden önce, 7 adet keçiyi de gebeliklerinin 78.gününden sonra olmak üzere toplam 25 adet keçiyi BVDV' u ile intranasal ve subkutan olarak enfekte ettilerini bildirmiştirlerdir. Araştırcılar (1991), gebeliklerinin 78. gününden önce enfekte edilen keçilerin hepsinde %100 oranında abort ve fotal ölüm ve gebeliklerinin 78 .gününden sonra enfekte edilen 7 keçide ise yüksek oranda fotal ölüm belirtmişlerdir.

Campen ve ark. (1997), geyikleri deneysel olarak BVDV' u ile enfekte ettilerini ifade etmişlerdir.

Loken ve ark. (1991), Norveç'te yaptıkları bir çalışma dahilinde 1317 yetişkin domuzda BVDV'una karşı oluşan antikor varlığını serum nötralizasyon (SN) testi ile araştırmışlar ve pozitiflik oranını %2,2 olarak belirlemiştirlerdir.

2.3. Patogenez

BVDV' u, gebeliğin dönemine bağlı olarak gebe sığırları enfekte ettiği zaman fötusları da çeşitli şekillerde etkileyebilmektedir (Larson 1996). BVDV' u ile çiftlik şartlarında ya da deneysel olarak gerçekleştirilen çalışmalarдан elde edilen sonuçlarda; abort, ölü doğumlar, konjenital anomalili buzağı doğumları, persiste enfekte buzağı doğumları ya da immun yanıt sahip buzağı doğumları gözlenmiştir (Brownlie ve ark. 1987, Brownlie ve ark. 1989).

Doğal şartlarda enfeksiyon geçirmemiş ya da BVDV'una karşı aşılanmamış gebe bir sığır virus ile enfekte olduğunda hastalığı subklinik veya orta şiddetli klinik belirtilerle sergiler ve nötralizan antikorlar oluşturur. BVDV' u plasentayı geçerek fötusu enfekte edebilir. Transplasental fotal enfeksiyonlar, gebeliğin farklı dönemlerinde fötusu çeşitli şekillerde etkileyerek oluşabilmektedir (Perdrizet ve ark 1987).

2.3.1 ncp BVDV ile Enfeksiyonun Patogenezi:

Duyarlı gebe sığırlar ncp BVDV ile enfekte oldukları zaman fötus çeşitli şekillerde etkilenebilmektedir. Virusun fötus üzerindeki etkileri fötusun yaşına bağlı olarak çeşitli şekillerde oluşmaktadır (Larson 1996).

a) ncp BVDV' u ile gebeliğin 40-120.günleri arasında enfekte olan fötusta persiste enfeksiyon şekillenmekte sağlıklı görünen buzağı ömür boyu çevresine virus saçmaktadır.

- b) 120-150. günler arasında enfekte olan buzağılarda konjenital defektler şekillenmekte ya da ölü doğular gerçekleşebilmektedir.
- c) 150.günden sonra etkilenen fötuslar sağlıklı doğarlar ve kolostrum almadan öncede BVDV'na karşı seropozitiftirler (Perdrizet ve ark.1987, Larson 1996)

Viremik doğan tüm buzağılar BVDV'unun ncp biyotipi ile enfekte olmuşlardır. Bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalarında BVDV'unun cp biyotipinin plasentayı geçtiğine dair bir bilgi yoktur (Brownlie ve ark. 1989). Done ve ark. (1980), gebeliğin erken dönemlerinde cp biyotipi ile enfekte ettileri hayvanlarda abort oluşturmuşlar ama tekrar elde ettileri virusun ncp biyotipi olduğunu bildirmiştirlerdir. Bu durum Brownlie ve ark. (1989) tarafından şu teorilerle açıklanmıştır:

- a) BVDV'un cp biyotipi plasentadaki maternofotal bariyeri geçememektedir.
- b) cp biyotipi fötusun erken dönemlerinde patojendir ama etkinliği fazla süremektedir.
- c) cp fötus gelişiminin erken dönemlerinde etkili olmakta daha sonra ncp biyotipine dönüşmektedir.
- d) cp biyotipi fotal hücreler ve sıvılar tarafından ncp biyotipine oranla daha çabuk inaktive edilebilmektedir.

2.3.2. Uterus İçi Enfeksiyonun Patogenezi:

Gebe bir sığır BVDV'u ile enfekte olduğu zaman virus kan yolu ile yayılarak plasentayı geçebilir. Ruminantlarda plasenta sindesmokoriyal yapıda ve 6 katlıdır. Plasenta gebeliğin çeşitli dönemlerinde yapısal olarak farklılık göstermektedir. Plasentayı geçen virus, fötusta konjenital bozukluklar, persiste enfekte doğum, enfeksiyon taşıyıcılığından ölüme kadar değişebilen konjenital bozukluklar oluşturabilir. BVDV'unun etkilediği gebe hayvanlarda en büyük risk grubunu gebeliğin erken döneminde bulunan hayvanlar oluşturmaktadır (Kahrs ve ark. 1980, Oirschot 1983, Jubb ve ark.1985, Brownlie ve ark.1987).

Fötus, gebeliğin 125. gününden önce BVDV'u ile enfekte olursa, immun sistem gelişimini tamamlamadığından antikor geliştiremez. Bu hayvanlar hastalığın ömrü boyu taşıyıcıları ve persiste enfekte olarak adlandırırlar. Klinik olarak sağlıklı görünümde olmalarına rağmen enfeksiyon subklinik olarak seyredebilir. Persiste enfekte hayvanlar BVDV'na karşı seronegatiftirler. Bu hayvanlar laboratuvar suşlarına karşı aşılandıkları zaman nötralizan antikorlar şekillendirmelerine rağmen orijinal virus her zaman persiste özelliğini korur (Jubb ve ark.1985, Brownlie ve ark.1987, Larson 1996).

Gebeliğin erken dönemlerinde BVDV'ı ile enfekte edilen hayvanların fötuslarının cerebellum ve beyinlerinin diğer bölümleri, dalak, böbrek, akciğerler ve barsağın bazı bölümlerinden BVDV'ı izole edilebilmektedir (Binkhorst ve ark. 1983).

Hubbert ve ark. (1973), yaptıkları bir çalışmada kesimhaneye getirilen 147 adet sığır fötusundan elde ettikleri böbrek, beyin, karaciğer, akciğer, ince barsak, dalak ve timustan hazırladıkları homojenatları embriyonel sığır böbrek hücre kültürlerine inokule ettiklerini, 3 fötusa ait homojenatlardan ve ayrıca annelere ait plasentadan hazırlanan homojenatlardan iki tanesinden ncp BVDV'ı izole etmeyi başardıklarını bildirmiştir.

Lucas ve ark. (1986), çeşitli dönemlerde elde ettikleri 330 adet fötusu BVDV antikorları yönünden incelemişler ve BVDV (-) olarak belirlenen 8 adet fötustan ncp virusu izole etmeyi başarmışlardır.

Bezek ve ark. (1988), kolostrum verilmemiş 5 adet buzağıyı BVDV'unun cp biyotipi ile enfekte etmişler ve bu buzağıların lenfosit ve lökositlerden günlük hazırladıkları sürme prepatlardan immun floresan (IF) testi ile virusu izole etmeyi başarmışlardır.

BVDV'u, gebelik esnasında teratojenik bir ajan olarak fötusu etkileyebilir. Fötal gelişimde bu tip bozukluklar malformasyon olarak nitelendirilir. Teratojenik etkenler fötusu genel ya da lokal olarak etkileyebilir. Fötus 120. günden önce virusla temas ederse fötal immun cevap oluşturulmadığından BVDV'u bütün fötusa yayılabilir ve fötusun bu enfeksiyona karşı koyması imkansız hale gelir. Fötal gelişimin geç dönemlerindeki enfeksiyonlar immun mekanizma tarafından elemine edilebilir (Casaro ve ark. 1971). Virus enfeksiyonu fötusun organogenezis safhasında oluşursa malformasyonlar ve büyümeye gecikme (Intrauterine Growth Retardation - IUGR) olguları gözlenebilir. Teratojenik etkiler fötal dokuların gelişimi ve farklılaşması üzerine olumsuz etkiler yapabilir. Fötal dokuların viral teratojenlere duyarlılığı enfeksiyon oluşu anda fötusun yaşına bağlıdır (Oirschot 1983).

Done ve ark. (1980) gebeliğin 100.gününde BVDV'una maruz kalan gebe bir hayvandan doğan buzağılarda IUGR olguları saptamışlardır.

Schultz (1973), gebeliğin 113-143. günlerinde BVDV ile enfeksiyonda fötusta cerebellar lezyonlar gözlediğini bildirmiştir. Casaro ve ark. (1971), gebeliğin 100-150. günlerinde BVDV ile enfekte olan fötuslarda fötal lezyonlar ve cerebellar hipoplazinin gözlediğini doğan buzağılarda tespit ederek kanıtlamışlardır.

Binkhorst ve ark. (1983), 130 adet Holstein ırkı sığırdan oluşan bir sürüyü buzağılarda görülen anomaliler yönünden 4 yıl boyunca incelemişler, elde edilen buzağılardan 11'inin sinir sistemi semptomları, nistagmus, ciddi anlamda inkoordinasyon

bozuklukları ve titreme gibi belirtiler gösterdiklerini belirterek 11 buzağıdan ölen 2'sinde hipomyelinizasyon ve anormal glial hücreler ve 1'inde de beyin lezyonları tespit ettilerini bildirmiştir.

Seronegatif anneler gebeliğin erken dönemlerinde BVDV'u ile enfekte olurlarsa bu her zaman fötal enfeksiyonlarla sonuçlanmaktadır. Gebeliğin dönemine göre fötusun ölümü, abort, intrauterine büyümeye geriliği, göz bozuklukları (mikroftalmi, katarakt, retinal dejenerasyon, atrofi, displaz, optik nevritis) ve beyin lezyonlarıyla karakterize malformasyonlar oluşmaktadır (Oirschot 1983, Jubb ve ark. 1985, Baker 1987, Brownlie ve ark. 1987, Radostits ve Littlejohns 1988, Houe ve Meyling 1991).

Hewicker-Trautwein ve ark. (1995), gebeliğin 90-118. günlerinde bulunan 33 adet sığırı canlı modifiye BVDV aşısı ile aşıladıktan sonra doğan buzağılardan 6 tanesinin intrauterin enfeksiyona bağlı olarak cerebellar hipoplazi, hidransefali, internal hidrosefalus, mikroensefali'li olarak doğduğunu bildirmiştir. BVDV'unun gelişimde olan fötus üzerindeki teratojenik etki mekanizması; normal hücre gelişiminin engellenmesi ya da çarptırılması, virus çoğalmasının direkt bir sonucu olarak mitotik aktiviteleri yüksek fötal hücrelerin tahrip olması ve vasküler lezyonların oluşumu şeklinde yorumlanmaktadır (Oirschot 1983).

2.3.3. Mukozal Disease'in Patogenezi:

MD, BVDV'unun ncp biyotipi ile gebeliğin erken dönemlerinde enfekte olan annelerden doğan persiste enfekte buzağıların BVDV'unun cp biyotipi ile tekrar enfekte olmalarıyla gelişen süperenfeksiyonun sonucunda oluşan bir hastalıktır (Baker 1987, Perdrizet ve ark. 1987, Radostits ve Littlejohns 1988, Brownlie 1990).

Castrucci ve ark. (1994), immunsupresyonla MD'nin oluşmasına olanak sağlanması sağlanamayacağını belirlemek amacıyla yaptığı bir çalışmada 6 adet buzağıyı 2 gruba ayırrarak 3 tanesini cp BVDV biyotipi ile, 3 tanesini de ncp BVDV biyotipi ile intravenöz olarak enfekte etmişlerdir. 30 gün içinde cp biyotipi ile enfekte edilen buzağılarda ateş, lökopeni ve diyare gelişirken, ncp biyotip ile enfekte edilen hayvanlarda klinik belirti gelişmediği ve 30. günün sonunda her iki grupta bulunan buzağıların 0,1 mg/kg hesabıyla 5 gün süreyle dexamethazone tedavisine tabi tutulduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar (1994), dexamethazone uygulanmasıyla birlikte ncp biyotiple enfekte edilen buzağılarda da ateş, lökopeni ve dispne tespit ettilerini ve sonuç olarak kortikosteroidlerin immun sistemi baskıladığını belirlediklerini ifade etmişlerdir.

Liebler ve ark. (1991), persiste viremik olarak doğan ve nötralizan antikor taşımayan yaşları 2 ay ile 5 ay arasında değişen 9 adet buzağıyı, BVDV'unun cp biyotipi ile enfekte ederek, inoculasyonu takiben 14.günde ötenazi ettiğlerini ve bu hayvanlarda sindirim sistemi bozuklukları ile karakterize MD saptadıklarını rapor etmişlerdir.

2.4. Klinik

Sığırlarda BVDV enfeksiyonu üç şekilde sonuçlanabilir:

- a) BVD-Primer postnatal enfeksiyon
- b) Fötal Enfeksiyon
- c) Mucosal Disease (Potgieter 1997)

İmmunkompetans yani virusa karşı antikor geliştirme yeteneğine sahip hayvanlar BVDV'a karşı nötralizan antikor şekillendirebilmekte ve virusun eleminasyonunu sağlayabilmektedirler. BVDV'u ile enfekte olan hayvanlarda enfeksiyon, klinik semptomlar olmaksızın subklinik olarak seyredebilmektedir. Bu nedenle klinik semptomlar tespit edilmese bile serolojik taramalarda hayvanlardan büyük bir kısmı seropozitif olarak tespit edilebilmektedir (Harkness ve ark. 1978).

Enfeksiyon; depresyon, ateş, hafif diyare, geçici lökopeni ile karakterizedir. Bu semptomları takiben birkaç gün içinde iyileşme söz konusudur (Radostits ve Littlejohns 1988).

Gebe sığırlar ve dolayısıyla fötusları gebeliğin dönemlerine bağlı olarak BVDV'u ile enfeksiyondan çeşitli şekillerde etkilenmektedirler. Oluşan lezyonlar arasında abort (Casaro ve ark. 1971, Duffell ve Harkness 1985, Brownlie ve ark. 1998), fötal mumifikasyon (Liess 1990, Moerman ve ark. 1994, Weiss ve ark. 1994), konjenital anomali (Kahrs ve ark. 1980, Roeder ve ark. 1986, Baker 1987), beyin ve göz lezyonları (Schultz 1973, Oirschot 1983, Hewicker-Trautwein ve Trautwein 1994, Hewicker-Trautwein ve ark. 1995), intrauterin büyümeye geriliği (Jubb ve ark. 1985, Baker 1987, Brownlie ve ark. 1987, Radostits ve Littlejohns 1988, Houe ve Meyling 1991) ve persiste enfekte buzağı doğumları (Liess 1985, Liess 1990, Moenning 1990, Bruschke ve ark. 1998) sayılabilir.

Klinik olarak persiste enfekte buzağıları belirlemek oldukça zordur. Fakat persiste enfekte buzağıların normal buzağılardan daha zayıf görünümü sahip oldukları ve daha yavaş gelişikleri bildirilmektedir (Perdrizet ve ark. 1987, Radostits ve Littlejohns 1988).

Houe ve Meyling (1991), 19 adet süt sığırı sürüsünde BVDV yönünden persiste enfekte sığırları belirlemek için yaptıkları bir çalışmada sığır hücre kültürlerinde immunperoksidaz boyamayı virolojik olarak immunperoksidaz boyamayı takiben sığır hücre kültürlerinde ve serolojik olarak SN testi ile incelemiştir. Toplam 2570 sığının kan serumu örneğinin incelendiği çalışmada, persiste enfekte inek oranının %1,4 olduğunu persiste enfekte sığırların antikor yönünden negatif bulunduğu ve diğerlerinin ise pozitif olarak tespit edildiğini belirtmişlerdir.

Seronegatif sığırların gebeliğin erken dönemlerinde (120. günden önce) BVDV'unun ncp biyotipi ile enfekte olmaları sonucu gerçekleşen transplasental enfeksiyonda immun sistemi gelişmeyen fötus bir immun yanıt oluşturamayacağından BVDV'una karşı immuntolerans olacaktır ve persiste enfekte buzağı doğum'u gerçekleştirektir. Persiste enfekte olarak doğan buzağı BVDV'unun cp biyotipi ile enfekte olursa süperenfeksiyon sonucu MD gelişirecektir (Baker 1987, Brownlie 1990, Moening 1990, Deregt ve Loewen 1995. Thur ve ark. 1997).

MD. genellikle 6-24 ay arasındaki sığrlarda meydana gelen BVDV enfeksiyonu olarak tanımlanır. Hastalık düşük morbidite ve yüksek mortalite ile karakterize edilmiştir (Baker 1987, Radostits ve Littlejohns 1988).

Araştırmacılar, MD'in deneysel olarak oluşturulabileceğini bildirmiştir (Brownlie 1990, Moening ve ark. 1990, Nakajima ve ark. 1993).

Akut MD aniden başlayan klinik hastalıkla karakterizedir. Morbitide düşük olmasına rağmen ölüm oranı %100'dür (Radostits ve Littlejohns 1988, Nakajima ve ark. 1993). Akut MD'de depresyon, anoreksi ve zayıflığın yanı sıra 40,5-41 °C derece ateş söz konusudur (Baker 1987, Radostits ve Littlejohns 1988). Klinik belirtilerin ortaya çıkışlarından sonra taze veya pihtılaşmış kan içeren sulu ve pis kokulu bir diyare söz konusudur. Diyarenin içinde fibrinöz yapıda mukozal parçalar mevcuttur (Baker 1987, Radostits ve Littlejohns 1988, Moening 1990). Akut MD olaylarında ağız lezyonları da önem taşır. Dudaklar, dil, diş etleri, ağız kenarı ve sert damağın üst kısmında eroziv lezyonlar gözlenir (Baker 1987, Radostits ve Littlejohns 1988).

Klinik belirtileri takiben yaklaşık 10 gün içinde ölümler meydana gelmektedir. MD'li hayvanlardan BVDV'unun hem cp hem de ncp biyotipi izole edilmiştir (Deregt ve Loewen 1995).

Akut MD'li hayvanlar ölmeler ise hastalık kronik bir hal alabilir. Kronik MD olarak nitelenen bu durumda hayvanlarda devamlı ya da aralıklı diyare, zayıflama, kronik timpani, nazal ve oküler akıntı, tırnak ve deri lezyonları çok sık gözlenmektedir (Baker 1987, Radostits ve Littlejohns 1988).

Kronik MD'li hayvanların persiste enfekte (PI) hayvanlardan ayrı edilmeleri gerekmektedir (Radostits ve Littlejohns 1988).

2.4.1. Virulent noncytopathogen BVDV'unun Kliniği:

Son yıllarda, BVDV'unun ateş ve diyare ile karakterize orta şiddetteki klinik belirtilerinden, öldürücü MD'ye kadar değişen şekillerdeki etkilerine ilaveten yeni bir sendrom daha belirlenmiştir. BVDV'unun ncp biyotipi ile gerçekleşen bu yeni sendromda trombositopeni ve hemoraji mevcuttur (Bezek ve ark. 1994, Deregt ve Loewen 1995).

Bu sendromda klinik belirtiler; hemoraji, enjeksiyon yerlerinde anormal kanama, kanlı ve mukoza parçalarının karışık olduğu diyare şeklinde olmaktadır (Deregt ve Loewen 1995). İngiltere'de bu klinik belirtileri gösterip 48 saat içinde ölen sığirlardan elde edilen virus BVDV'unun ncp biyotipi olmuştur (Deregt ve Loewen 1995).

Virulent ncp BVDV'u ile BVDV'unun klasik formları arasında serolojik farklılıklarda bulunmaktadır. Bunun yanında genomlarındaki 5' bölgelerinde de farklılıklar mevcuttur (Deregt ve Loewen 1995).

Gufler ve ark. (1997), BVDV'unun ncp biyotipi ile enfekte bir buzağıda yaygın kanama ve anemi ile karakterize bir hemorajik sendrom bildirmiştir.

2.5. Teşhis

Gebe sığirlarda ve buzağılarda BVDV enfeksiyonuna yönelik virusun ya da viral抗原lerin tespiti direkt yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir (Howard ve ark 1990, Moermann ve ark 1993). BVDV enfeksiyonlarının serumdaki antikorlara yönelik olarak belirlenmesinde ise indirekt teşhis yöntemleri kullanılmaktadır. Gebe sığirlarda ve bunların buzağılarında persiste enfeksiyonların belirlenmesi amacıyla annelerin ve buzağıların lökositlerinden virus izolasyonu amaçlanmakta indirekt olarak ise, anne serumları ve prekolostoral yavru serumlarında antikor taraması yapılmaktadır (Coria ve ark 1983, Coulibaly ve ark 1986).

BVDV'unun teşhisinde, sürüdeki hayvanların düzenli olarak gruplandırılması, örneklenmesi, doğumlarından itibaren hayvanlar hakkındaki tüm bilgilerin detaylı olarak bilinmesi önem taşımaktadır (Liess 1990).

2.5.1. Direkt Teşhis

BVDV antijenlerinin belirlenmesine yönelik testler arasında en çok kullanılanlar: İmmun Floresans (IF) Testi (Cutlip ve ark. 1980, Kahrs ve ark. 1980, Hyera ve ark. 1985, Baker 1987, Howard ve ark. 1990, Burgu ve ark. 1990, Alkan ve Burgu 1993, Deregt ve Prins 1998), Peroxidase Linked Assay (PLA) (Hyera ve ark. 1985, Hyera ve ark. 1987, Howard ve ark. 1990, Kirkland ve ark. 1991, Moerman ve ark. 1993, Deregt ve Prins 1998), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Brinkhof ve ark. 1996, Thur ve ark. 1997, Deregt ve Prins 1998), İnterferens (Kahrs ve ark. 1980, Shimizu ve Satou 1987). Polymerase Chain Reaction (PCR) (Laamanen ve ark. 1997), plak test (Xue ve ark. 1996, Jian ve ark. 1997), immunplak (Karaoglu 1996), hibridizasyon (Brock ve ark. 1993), sentetik oligonükleotidler (Lewis ve ark. 1991), antijen capture (Deregt ve Prins 1998), streptovidin/biotin teknik (Allan ve ark. 1989), flow cytometry (Qvist ve ark. 1991) metodlarıdır.

Fernelius ve Lambert (1969), 11 adet buzağının dalak, akciğer ve submaksillar lenf düğümlerinden hazırladıkları süspansiyonları embriyonik bovine kidney hücre kültürlerine inokule ederek IFT ile BVDV antijenlerini tesbit etmişlerdir.

Fernandez ve ark. (1989), BVDV' u ile persiste enfekte olmuş 25 sığırın sentral sinir sisteminde viral antijenleri belirlemek için yaptıkları çalışmada, domuzlardan elde ettikleri poliklonal antiserumları kullanarak IF ve PLA testleri ile BVDV antijenini nöronlarda tespit etmişlerdir.

Bolin ve ark (1985), 3157 adet sığırdan elde ettikleri lökosit numunelerini IFT ile BVDV' u yönünden test etmişlerdir. Araştırcılar (1985), 3157 adet sığırın 60'ından BVDV antijenini tespit ettiklerini ifade etmişlerdir.

Özkul (1992), 50 adet gebe ineğe ve bunların fötuslarına ait toplam 353 kan ve farklı organ numunelerini BVDV antijenleri yönünden incelemiştir. Araştırcı (1992), seronegatif bir anneye ait lökosit ve bu annenin fötusuna ait kan ve organ numunelerinde BVDV antijeni tespit ettiğini ifade etmiştir.

Laamanen ve ark. (1997), Finlandiya'da BVDV' u ile enfekte olarak tespit edilen 41 adet sığır sürüsünden elde ettikleri 403 adet sığır kan serumu örneğinde direkt olarak

BVDV'unu tespit etmek amacıyla RT-PCR ve hücre kültüründe immunperoksidaz testlerini karşılaştırmalı olarak uygulamışlar ve çalışmanın sonucunda her iki testi de kullanarak 48 adet virus izole etmeyi başardıklarını ifade etmişlerdir. Araştırcılar (199⁻). çalışmalarında hücre kültürü ve RT-PCR'nin sonuç olarak uyumlu testler olmasına karşın hücre kültürü kullanımındaki dezavantajların (zaman, malzeme, kontaminasyon riski) RT-PCR'de bulunmaması ve serumdan direkt olarak etkenin izole edilmesine bağlı olarak RT-PCR'nin çok daha avantajlı bir test olduğunu vurgulamışlardır.

Son yıllarda BVDV抗原larının belirlenmesinde yaygın olarak immunohistokimyasal yöntemlerden de yararlanılmaktadır. Dondurulmuş dokulardan kesitler alınarak ya da formalin ile fikze edilmiş veya parafin emdirilmiş dokuların monoklonal antikorlarla inkube edilmesi sonucu抗原in belirlenmesi esasına dayanan bu yöntemler BVDV抗原larının belirlenmesi bakımından yaygın olarak kullanılmaktadır (Thur ve ark. 1997).

Thur ve ark. (1997), 21 adet sığır fötusunu BVDV yönünden immunohistokimyasal yöntemlerle incelemişler ve fötusların beyin, deri, tiroid, abomazumlarından cryostat section metoduyla BVDV'unu tesbit ettiklerini bildirmiştir.

2.5.2. İndirekt Teşhis

BVDV enfeksiyonlarına karşı oluşan antikorların belirlenmesiyle enfeksiyonun varlığı ortaya koymaktadır. Bu amaçla hayvanlardan kan alınarak serumlar elde edilmektedir.

Fötal enfeksiyonların belirlenmesinde fötal ya da prekolostral kan serumları alınarak çeşitli testlerde kullanılmaktadır. BVDV enfeksiyonlarının indirekt teşhis amacıyla yaygın olarak kullanılan testler arasında; Serum Nötralizasyon (SN) (Hafez ve ark. 1976, Coria ve ark. 1984, Frey ve ark. 1987, Bolin ve Ridpath 1990, Reinhardt ve ark. 1990, Loken ve ark. 1991). İndirekt IF (Ohmann 1983, Lucas ve ark. 1986, Corapi ve ark. 1990), Agar Gel Immunodiffusion (AGID) (Derbyshire 1962, Diderholm ve ark. 1974, Harkness ve ark. 1978, Coria ve ark. 1984, Kirkland ve ark. 1991), ELISA (Baker 1987, Traven ve ark. 1991, Moerman ve ark. 1993, David ve ark. 1994, Taylor ve ark. 1995), Neutralisation Peroxidase Linked Assay (NPLA) (Ohmann 1983, Hyera ve ark. 1987, Depner ve ark. 1991) ve Complement -fixation (CF) (Harkness ve ark. 1978) testleri bulunmaktadır.

Reinhardt ve ark. (1990), Şili'de BVDV'a karşı oluşan antikorları belirlemek amacıyla SN testini kullanarak yaptıkları bir çalışmada 948 adet sığirden 700 adedini (%73,8) BVDV yönünden pozitif bulmuşlardır.

Bock ve ark. (1986), 886 adet sığır kan serumu ve BVDV'u ile deneysel olarak enfekte edilmiş 6 buzağıdan aldığı kan serumlarını BVDV'una karşı oluşan antikorlar yönünden SN ve ELISA testleri ile karşılaştırmalı olarak araştırmışlardır. Araştırcılar (1986), 886 adet sığır kan serumunda her iki test arasında %96,3 oranında benzer sonuçlar tespit ederken, enfekte ettiğleri buzağılarda 14. günde SN testi ile antikor belirleyemediklerini, ELISA testi ile 7. günde 3 buzağıda antikor belirlediklerini ifade etmişlerdir. Araştırcılar (1986), enfeksiyondan sonra SN testi ile 28-70. günlerde 2 buzağıda 1/4096, 1 buzağıda ise 1/16384 titrede antikor tespit ederken, ELISA testi ile 42. günde 3 buzağıdan ve 98. günde kalan 3 buzağıdan 74-109 ELISA ünitesi antikor tespit etmişlerdir. Çalışmada sonuçların paralelliğine rağmen ELISA testinin SN testinden daha hassas olduğunu ifade etmişlerdir .

Harkness ve ark. (1978), toplam 142 adet sığır kan serumunu BVDV'una karşı oluşan antikorlar yönünden SN, CF ve AGID testleriyle incelemiştir. Araştırcılar (1978), BVDV'una karşı oluşan antikorları SN testi ile 142 hayvanın 108'inde (%76,1) tespit ederken CF testi ile 142 hayvanın 66'sında (%46,5) ve AGID testi ile 142 hayvanın 65'inde (%45,8) tespit ettiğini ifade ederek, SN'un BVDV enfeksiyonlarının indirekt teşhisinde güvenilir bir test olarak kullanılabilceğini vurgulamışlardır.

Harkness ve ark. (1978), tarafından Robson ve ark. (1960), SN testinin BVDV enfeksiyonlarına karşı oluşan antikorları tespit etmede %95 hassasiyete sahip olduğunu bildirdikleri ifade edilmiştir.

2.6. İmmunoloji

BVDV'ı ile daha önce enfekte olmamış, antikor yönünden negatif olan hayvanlar virus ile karşılaştıkları zaman antikor oluşturmaktadırlar. Bu antikorlardan en önemlileri nötralizan antikorlar olarak bilinmektedir. Nötralizan antikorlar enfeksiyondan sonra 3-4 hafta içinde belirlenebilmekte ve yaklaşık bir yıl koruma sağlamaktadırlar (Duffell ve Harkness 1985, Roeder ve Harkness 1986).

Sığırlarda plasenta tipi sindesmokoriyal'dır. Plasentanın yapısı gereğince gebelik süresince annede bulunan antikorlar yavruya aktarılamaz (Schultz 1973, Oirschot 1983).

Gebe hayvanların virusu plasenta yoluyla yavrularına aktarmaları sonucu fötus, yaşına bağlı olarak immun yanıt geliştirebilmekte ya da immun cevap oluşturamadığından virustan çeşitli şekillerde etkilenebilmektedir (Casaro ve ark. 1971).

BVDV' u ile enfeksiyonu takiben yaşayan fötus için bazı durumlar söz konusudur :

- a) Fötus enfekte eden virusa karşı immuntolerans hale gelir. Gebeliğin 120. gününden önce enfeksiyonda bu durum söz konusudur.
- b) Virus selektif olarak germinal merkezleri tahrip eder. Bu tahrip sonucu teratojenik defektlere sebep olur. Bu durum gebeliğin ikinci 1/3 lük döneminde söz konusudur (Larson 1996).
- c) Fötus, immun yanıt yeteneğine sahip olarak virusa karşı immunite sağlar. Gebeliğin 120. gününden sonra bu durum söz konusudur (Casaro ve ark. 1971).

İmmunolojik fonksiyonlarda iki komponent lenfoid sistemin etkili olduğu bildirilmektedir (sadece memelilerde). Primer lenfoid organları içeren bu sistem; T (Thymus) hücre sistemi ve B (Bursa) hücre sistemi olmak üzere ikiye ayrılır. B hücre sistemi memelilerde kemik iliğine karşı gelmektedir. T hücre sistemi hücreye bağlı immuniteye ait fonksiyonlara yerine getirirken, B hücre sistemi immunglobulin üreten hücreleri oluşturma görevini üstlenmiştir (Schultz 1973). Sığır fötuslarında yaklaşık olarak thymus 40. günde, kemik iliği ve dalak 55. günde, lenf nodülleri 60. günde, peyer plakları ve tonsiller 175. günde belirlenebilir. Periferal kanda ise, lenfositler yaklaşık 45. günde tespit edilebilirken, IgM taşıyan B hücreleri 60. günde ve IgG taşıyan B hücreleri 135. günde belirlenebilmektedir (Schultz 1973). Schultz (1973), immunfluoresans testi ile 59 günlük fötusun dalak hücrelerinde IgM varlığını bildirmiştir. Aynı çalışmada (1973) IgG taşıyan hücrelerin 145 günlük fötusta belirlendiği ifade edilmiştir.

Pestivirüslerle ilgili konjenital enfeksiyonlarda lenfoid doku tahribatını gösteren bulgular bildirilmiştir. BVDV ile enfekte hayvanlarda; histiosit hiperplazisi, retiküloendoteliyal sistem hücre proliferasyonu, timik involusyon, atrofi ve deplesyon saptanabilmektedir (Oirschot 1983).

BVDV' u dalak, lenf yumruları gibi çeşitli lenfoid organlara ilgi göstermekte ve immunsupresyon şekillendirilmektedir. BVDV ile enfekte hayvanlarda interferon yapımının baskılanmasının yanı sıra lenfosit, monosit, polimorfnükleer lökosit fonksiyonları bozulmakta ve humoral antikor yapımı da olumsuz yönde etkilenmektedir (Duffel ve Harkness 1985, Perdrizet ve ark. 1987).

Ohmann (1988), klinik olarak normal görünen persiste enfekte sığırlarda yaptığı bir çalışmada immunperoxidase ve immunohistokimyasal yöntemlerde lenfosit ve

makrofajların yanı sıra ileum, kolon, akciğerler, deri, beyin, timus ve dalağın epitel hücrelerinden MDBK hücre kültüründe hem BVDV'unu izole etmiş hem de viral antijenleri belirlemiştir. Araştırcı (1988), rumen, omasum, abomasum, özefagus ve dil epitellerinden de viral antijenleri belirlediğini ifade etmiştir.



3.MATERYAL VE METOT

3.1. Virus

Direkt immunfloresans (DIF) ve serum nötralizasyon (SN) testlerinde BVDV'unun sitopatojen (cp) NADL suçu, Direkt immunoperoxidase (DPLA) testinde ise BVDV'unun nonsitopatojenik suçu olan 0712 suçu kullanıldı.

3.2. Hücre Kültürü

Araştırmada Fötal Dana Böbrek (FDB) hücreleri kullanıldı. FDB hücreleri Ankara Çubuk mezbahasında kesilen gebe ineklerden alınan fötuslardan hazırlandı. Direk İmmunofloresan (DIF), direk immunperoksidaz (DPLA) ve serum nötralizasyon (SN50) testlerinde kullanılan FDB hücrelerinin BVD kontaminasyonu yönünden negatiflikleri kullanılmadan önce DPLA testiyle kontrol edildi.

3.3. Konjugatlar

Araştırmada DIF ve DPLA testinde kullanılan BVDV konjugatı A.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalından temin edildi.

3.4. Dana Serumu

Hücre kültürlerinde kullanılan dana serumu Ankara Çubuk mezbahasında kesilen danalardan sağlandı. 56 °C'de 30dk. inaktive edilen serumlar membran filtre yöntemi ile steril edildi. Sterilite kontrolleri yapılan serumlar -20 °C'lik dipfrizde saklandı. Serumlar kullanıma sokulmadan önce BVDV virusu yönünden negatiflikleri DPLA testi ile kontrol edildi.

3.5. Virus İzolasyon Materyalleri

Virus izolasyonu amacıyla araştırmada 62 adet gebe inekten, bu ineklerin doğumunda kolostrum almamış buzağılardan ve annelerinden, son olarak doğum takiben ortalama 3 ay içinde buzağılardan olmak üzere 124 adet hayvandan elde edilen toplam 248 adet kan örneği EDTA'lı tüplere alınarak lökositleri elde edildi.

3.6. Serum Numuneleri

Virus izolasyonu amacıyla EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerine paralel olarak serum elde etmek amacıyla normal tüplere kan örnekleri alındı. Normal tüplere alınan kan örnekleri 1500-2000 devirde 15-20 dk. santrifüj edildi. Serumlar elde edildi. Bu serumlar kullanılıncaya kadar -25°C'lik dipfrizde saklandı. BVDV antikorları yönünden SN testine tabi tutulacak olan bu serumlar kullanılmadan önce 56 °C'lik su banyosunda 30 dk. inaktivasyon işlemine tabi tutuldu.

3.7. Virusların Üretilmesi

Bu amaçla 2 adet 500 ml'lik hücre kültürü şişelerinde üretilen FDB hücrelerinin vasatları döküldü. Hücre yüzeyleri 37°C'lik su banyosunda ısıtılan PBS ile yıkandı. Hücre kültürü şişelerinden birine BVDV'unun cp suyu olan NADL'dan 0,5 ml, diğerine ncp suyu olan 0712'den 0.5 ml inokule edilerek 37 °C'lik etüvde virusun hücreye adsorbsiyonu için 1 saat bekletildi. Adsorbsiyondan sonra hücre kültürü şişelerine ELA+EMEM vasatından ilave edildi. Hücre kültürleri 5 gün süreyle inkubasyona bırakıldı. Virus inokule edilen ve kontrol olarak bırakılan kültür şişeleri her gün patolojik değişiklikler yönünden kontrol edilmek amacıyla doku kültürü mikroskobunda incelendi. NADL'in %90 oranında sitopatolojik efekt (CPE) gösterdiği 72. saat sonunda, ncp biyotip 0712'nin inokulasyonu izleyen 5. gün sonunda inokule edildikleri hücre kültürü şişeleri -80°C de donduruldu. 37°C'lik su banyosunda tekrar çözülen hücreler 3000 devirde 30 dakika santrifüj edildikten sonra 1'er ml'lik hacimlere bölünerek -80°C de saklandı.

3.8. Virusların Titrasyonu

BVDV'unun cp suşu NADL'in titresi Frey ve Liess (1971)'in bildirdiği yöntemle tespit edildi. Bu amaçla virus ELA+EMEM vasatı içinde Log_{10} tabanına göre sulandırıldı. Hazırlanan her sulandırma basamağından mikropleyt üzerindeki 4'er göze 0.1'er ml konuldu. Hücre kontrol için ayrılan 4 göze 0.1 ml %5 FDS içeren ELA+EMEM vasatı, virus kontrol için ayrılan 4 göze ise 0.05 ml sulandırılmamış saf virus, 0.05 ml serumsuz ELA-EMEM vasatı konuldu. Tüm gözlere özel pipet yardımıyla 3×10^5 hücre/ml olacak şekilde hazırlanan FDB hücre kültürü süspansiyonundan 0.05'er ml damlatıldı. Mikropleyt 37°C lik CO_2 'li etüve kaldırılarak inkubasyona bırakıldı. Tüm gözler doku kültürü mikroskobunda her gün incelenerek hücrelerdeki sitopatolojik değişiklikler saptandı. Elde edilen sonuçlar Kaerber (1964) metoduna göre hesaplanarak virusun titresi tespit edildi.

DIF ve DPLA testlerinde kullanılan ncp 0712 biyotipin titresi ise Orban ve ark. (1983)'nin bildirdiği yönteme göre yapıldı. Cell Culture Staining Chamber (CCSC) sisteminin gözlerine yerleştirilerek steril edilen lameller üzerinde FDB hücreleri üretildi. Bu amaçla %5 FDS içeren ELA+EMEM vasatı ile 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde sulandırılan hücreler CCSC sisteminin gözlerine inokule edilerek 48 saat süre ile 37°C lik CO_2 'li etüvde inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda Log_{10} tabanına göre sulandırılmış virusa ait her sulandırma basamağından sistemin gözlerine 0,1 ml inokule edilerek 72 saat inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda aseton kullanılarak fikze edilen hücreler Florescein Isotiocyanat (FITC) ile boyanmış olan konjugat ile muamele edilerek floresans mikroskobunda sonuçlar değerlendirildi.

3.9. Hücre Kültürünin Hazırlanması

FDB hücre kültürlerinin hazırlanmasında Ankara Çubuk Belediyesi mezbahasında kesilen gebe hayvanların fötuslarının böbrekleri kullanıldı. Laboratuvara getirilen fötüslerin steril şartlarda böbrekleri alındı. Kapsülesi ayrıldı ve korteks tabakasından makas yardımıyla küçük parçalar alındı. Petri kutusunda çift bistüri ve makas yardımıyla daha küçük porsiyonlara ayrılan doku parçacıkları erlenmayere aktarılıarak Phosphate Buffer Salin (PBS) ile en az 3 kez yıkandı. Daha sonra % 0.25'lik tripsin içine alınan doku parçaları oda ısısında, manyetik karıştırıcı üzerinde 6-7 kez tripsinizasyon işlemine tabi tutuldu. Her tripsinizasyon işleminden elde edilen tripsin+hücre karışımı $+4^\circ\text{C}$ de

bekletildi. Son tripsinizasyon işleminden sonra bu karışım 800-1000 devirde 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj işlemini takiben tüpün üzerindeki tripsin uzaklaştırıldı. Tüpün dibindeki hücre tortusu Earle's Laktalbumin + Eagle's Minimum Essential Medium (ELA+EMEM) vasatı ile pipete edilerek yıkandı ve tekrar 800-1000 devirde 10dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüpün üzerindeki ELA+EMEM vasatı uzaklaştırılarak dipdeki tortu ELA+EMEM vasatı ve fotal dana serumu ile 6×10^5 hücre/ml olacak şekilde sulandırıldı. Hücre süspansiyonu 1'er ml hacimlere bölündükten sonra %10 Dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edilerek kullanılıncaya kadar -80°C'lik dipfrizde saklandı. Dondurulan hücreler kullanılacağı zaman 37°C'lik su banyosunda çözüldükten sonra %20 inaktif dana serumu yada fotal dana serum (FDS) içeren ELA+EMEM vasatıyla sulandırılarak hücre kültürü şişelerine geçildi.

3.10. Lökosit Örneklerinden Virus İzolasyonu

Lökosit elde etmek amacıyla EDTA'lı tüplere alınan kan 2000 devirde 10-15dk. santrifüj edildi. Santrifüj süresi sonunda en alt kısmda yer alan eritrositler ve en üst kısmda yer alan plazma tabakasının ortasında beyaz bulutlanma tarzında Buffy Coat adı verilen lökosit tabası pastör pipetiyle çekildi. 3 kez PBS ile yıkandı. Son yıkamayı takiben lökositler 2 ml ELA+EMEM + %10 DMSO ilavesi ile virus saklama tüplerine aktarıldı ve kullanılıncaya kadar -80°C'lik dipfrizde saklandı. Hazırlanan lökosit örnekleri önceden DPLA testi ile kontrol edilen ve BVD yönünden negatif (-) olduğu belirlenen FDB hücrelerinde bir kez pasajlandı. Bunun için hücre kültürü tüplerine 2 ml ELA+EMEM + 0.2 ml FDS içeren bileşikten konarak 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde sulandırılan FDB hücrelerinden ilave edilerek 37°C'de 2 gün inkubasyona bırakıldı. İkinci günün sonunda vasatları boşaltılan hücre üretme tüplerindeki hücrelerin yüzeyi PBS ile yıkandıktan sonra lökosit numunelerinden 0,2 ml ilave 37°C'de 1 saat adsorbsiyona bırakıldı. Süre sonunda hücrelerin üzerine 2 ml ELA+ edilerek EMEM + %5 FDS'lu vasattan ilave edilerek 37°C'lik etüve kaldırıldı.

3.11. Konjugat Titrelerinin Hesaplanması

Bu amaçla Hyera ve ark. (1987)'in bildirdiği yöntem kullanıldı. CCSC sistem lamellerinde üretilen FDB hücresına daha önceden titresi hesaplanan ve 1000 DKID₅₀ oranında sulandırılmış ncp 0712 biyotipten 0.1 ml miktarında inocule edildi. 24 saat süren inkübasyondan sonra virus üretme vasatı dökülerek 0.1 M PBS ile yıkanan hücreler 10 dk müddetle aseton ile fikse edildi. Konjugat, %0.1 Tween-20 içeren 0.1M PBS ile 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50 oranlarında sulandırılarak her bir sulandırma için bir göze 0.1 ml miktarında inocule edildi. Bir saat süreyle 37 °C'de nemli ortamda inkubé edildi, 3 kez 0.1 M PBS ile yıkanan lameller %20'lik gliserin yardımıyla lam ile kapatıldı ve İmmun Floresan (IF) mikroskobunda kontrol edildi. Spesifik floresan parlamanın en iyi olduğu konjugat sulandırması tespit edildi. DPLA konjugatının titresi yine Hyera ve ark.(1987)'nin bildirdiği yöntemle 24 gözlü pleytlerde tespit edildi.

3.12. Direkt İmmunofloresans (DIF) Testi

Orban ve ark. (1983)'nın bildirdiği yönteme göre uygulandı. CCSC sistemi hazırlandı ve ultraviyole de 2 saat tutularak son sterilizasyonu gerçekleştirildi. BVDV yönünden negatifliği DPLA testiyle belirlenmiş ve ELA+EMEM + %5 FDS ile 1×10^5 hücre/ml olarak sulandırılan FDB hücrelerinden lameller üzerine 2'ser ml konuldu. 48 saat 37°C'lik etüvde inkubasyona bırakıldı. Daha sonra lökosit numunelerinin 1. pasaj sıvılarından her göze 0.2 ml inocule edildi. 1 saat adsorbsiyon süresinden sonra hücre yüzeyleri PBS ile yıkarak tüm gözlere 2 ml virus üretme vasatı ilave edildi. 3. günün sonunda vasatlar pastör pipeti ile çekilerek hücre yüzeyleri NaCl – Tween-20 ile yıkandıktan sonra hücreler aseton ile 10 dk fikzasyon'a bırakıldı. Titresi oranında (1/30) sulandırılmış konjugattan tüm gözlere 0.2 ml ilave edildi. 1 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresi sonunda pastör pipeti yardımıyla konjugat çekilerek hücre yüzeyleri 3 kez NaCl+Tween-20 ile yıkandı. Lam üzerine damlatılan %20'lik gliserin damlaları üzerine CCSC sistem lamelleri pens yardımıyla ters çevrilerek kapatıldı. Sonuçlar IF mikroskobunda belirlendi. Aynı zamanda hücre kontrol ve virus kontrol içinde gözler hazırlandı ve incelendi.

3.13. Direkt İmmunperoksidaz (DPLA) Testi

Hyera ve ark. (1987)'nın bildirdiği yönteme göre yapıldı. Bu amaçla 24 gözlü pleytler kullanıldı. BVDV'u yönünden negatifliği kontrol edilmiş FDB hücreleri 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde ELA+EMEM + %5 FDS ile sulandılarak tüm gözlere 1 ml olacak şekilde taksim edildi ve 37°C'lik etüvde inkubasyona bırakıldı. Ertesi gün lökosit 1. pasaj sıvılarından her göze 0.2'şer ml miktarında inokule edildi. 3 gün CO₂'li etüvde inkubasyona bırakıldı.

Süre sonunda tüm gözlerdeki vasatlar boşaltılarak hücre yüzeyleri PBS ile yıkandı. Yıkama işlemini takiben pleytler ters olarak kurutma kağıdı üzerine alınarak 80°C'de 1 saat süreyle bekletildi. Hücrelerin pleyt yüzeyine fikzasyonu sağlandı. Fikzasyonu işlemini takiben pleytler soğumaya bırakıldı. Konjugat ilavesi yapılmadan önce hücre yüzeyleri PBS + Tween 20 ile hafifçe ıslatıldı. Konjugat titresi oranında (1/30) PBS + Tween 20 ile sulandırılarak tüm gözlere 0.2 ml olacak şekilde dağıtıldı. Daha sonra shaker'a alınarak 1 saat süreyle konjugatın hücreye adsorbsiyonu için beklandı. Bu sürenin sonunda konjugat gözlerden uzaklaştırıldı. Hücre yüzeyleri 3 kez PBS+Tween 20 ile yıkandıktan sonra her göze 0.2 ml substrat ilavesi yapıldı. Substrat olarak 4.7 ml Na asetat + 0.3 ml Aminoethyl Karbazol – Dimetil formamiol + 2 damla H₂O₂ karışımı kullanıldı. 20-25 dk sonra doku kültürü mikroskobunda pozitif olarak kabul edilen kahverengimsi-kırmızı boyanmaların olup olmadığı kontrol edildi.

3.14. Serolojik Testler

3.14.1. Serum Nötralizasyon (SN) Testi

Test Frey ve Liess (1971)'in bildirdikleri yönteme göre yapıldı. Gebe inekler, bu ineklerin doğumu sırasında kendilerinden ve prekolostral buzağılarından, doğum takiben ortalama 3 ay içinde buzağılardan tekrar alınan kan serumu örneklerinin her biri için 96 gözlü mikropleyt üzerinde ikişer göz ayrıldı. Her bir serum örneğinden 10'ar µl alınıp önceden gözler ilave edilen 40 µl vasat üzerine konuldu. Tüm gözlere titresi oranında sulandırılmış virustan 50'şer µl ilave edildi. İnkubasyon için 1 saat 37 °C etüvde bekletildi. Bu sürenin sonunda tüm gözlere 3×10^5 hücre/ml olacak şekilde sulandırılmış

FDB hücresinden özel pipet yardımıyla 0,05 ml damlatıldı. Pleytler, 37°C'lik CO₂'li etüve kaldırıldı. 5.günde hücrelerde meydana gelen sitopatolojik değişiklikler doku kültürü mikroskobunda incelenerek sonuçlar değerlendirildi.

3.14.2. Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon₅₀ (SN₅₀) Testi

Mikronötralizasyon testinde, pozitif olarak tespit edilen serumlar SN₅₀ testine tabi tutuldu. 96 gözlü mikropleytte her serum için iki göz ayrıldı. Serumların 1:5'ten başlayarak 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 olmak üzere 6 basamaklı sulandırmaları gerçekleştirildi. İlk gözlere 0,1 ml 1:5 serum sulandırılması yerleştirildikten sonra takip eden 5 sullandırma basamağı için gözlere 0,05 ml hacimde ELA+EMEM + %5 FDS karışımından konuldu. Çok kanallı pipet yardımıyla 1:5'lik sulandırmadan alınan 0,05 ml hacimdeki serum sulandırması diğer gözlerdeki vasatlarda sırayla sulandırıldıktan sonra 6. sullandırma basamağından (1/160) 0,05 ml dışarıya atıldı. Sullandırma işleminden sonra tüm gözlere titresi bilinen virustan ($100 \text{ DKID}_{50} 10^{-5.3}/ 0,05 \text{ ml}$) 0,05ml damlatıldı. 37°C Clik CO₂'li etüvde 1 saat inkubasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda tüm gözlere 3×10^5 hücre/ml olacak şekilde ELA+EMEM + %5 FDS ile sulandırılmış FDB hücre süspansiyonundan 0,05 ml özel pipet yardımıyla damlatıldı. 37°C'lik CO₂'li etüvde inkubasyona bırakıldı. Tüm gözler doku kültürü mikroskobunda incelenerek 5. günün sonunda oluşan sitopatolojik değişiklikler tespit edildi. Virusu %50 oranında nötralize eden serum sulandırmaları Kaerber (1964) metoduna göre hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. Virus Üretilmesi

BVD-MD virusunun cp suşu olan NADL'ın FDB hücre kültürlerine inokulasyonu sonucu 1. günde ve 3.günün sonunda hücrelerde tipik CPE oluşturduğu gözlendi (Resim 2 ve Resim 3).

BVD-MD virusunun ncp suşu olan 0712 de FDB hücre kültürüne inokule edildi. 5 günlük bir inkubasyon süresi sonucu virus elde edildi.

4.2. Virusların Titresi

BVDV'unun NADL suşunun FDB hücre kültüründe mikrotitrasyon yöntemiyle yapılan titrasyonunda enfeksiyözite gücü $DKID_{50} = 10^{-7,5}/0,1 \text{ ml}$ olarak hesaplandı. 0712 suşunun enfeksiyözite gücü DIF testi ile $DKID_{50} = 10^{-4,5}/0,1 \text{ ml}$ olarak tespit edildi.

4.3. Konjugatların Titresi

FITC konjugatın titresi 1000 $DKID_{50}/0,1 \text{ ml}$ oranında sulandırılmış 0712 suşu ile yapılan DIF testi sonucunda 1/30 olarak tespit edildi.

Peroksidaz konjugatın titresi 1000 $DKID_{50}/0,1 \text{ ml}$ oranında sulandırılmış 0712 suşu ile yapılan DPLA testi sonucunda 1/30 olarak tespit edildi.

4.4. Direkt İmmunfloresans Testi Sonuçları

Orban ve ark. (1983)'nın, bildirdiği metoda göre CCSC sisteminde gerçekleştirilen bu testte virus kontrol pozitif (Resim 4) ve hücre kontrolün negatif olmasına rağmen, işlenen toplam 248 adet lökosit numunelerinde viral antijen yönünden pozitif sonuç elde edilemedi.

4.5. Direk İmmunperoksidaz Testi Sonuçları

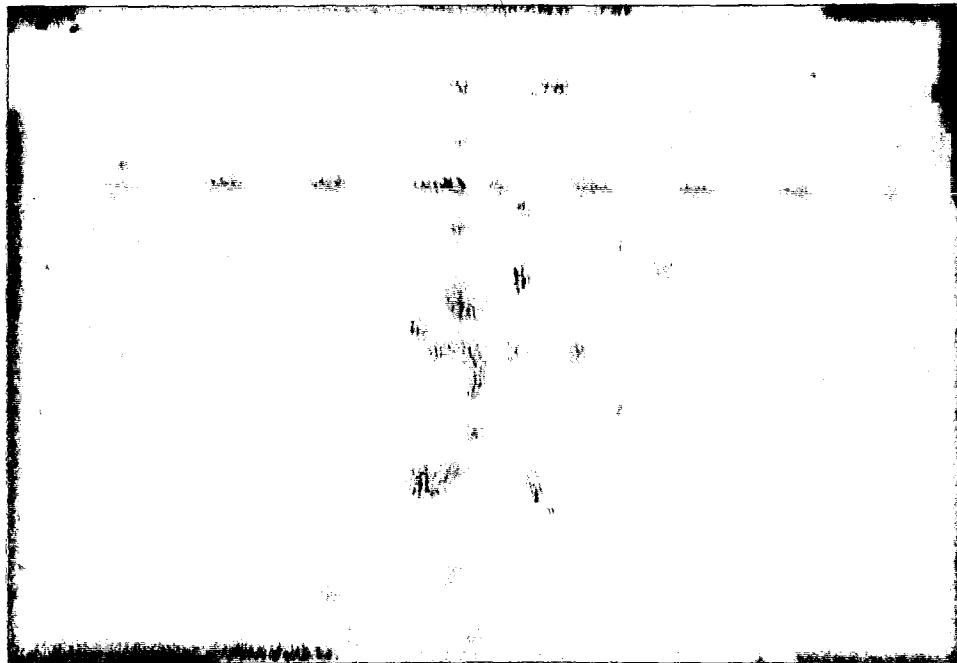
Hyera ve ark. (1987), bildirdiği yönteme göre yapılan testte toplam 248 adet lökosit numunesinin FDB hücre kültürlerinde yapılan pasajları sonucu elde edilen 1. pasaj sıvıları 24 gözlü pleytlerde BVDV antijenleri yönünden kontrol edildi. Virus kontrolün pozitif (Resim 5) ve hücre kontrolün de negatif olmasına karşın, incelenen lökosit numunelerinde viral antijen yönünden pozitif bir sonuç elde edilemedi.

4.6. Serum Nötralizasyon Testi Sonuçları

Gebe hayvanlardan alınan serum numunelerinin hepsi nötralizasyon testi ile BVDV'una karşı oluşan antikorlar yönünden pozitif olarak tespit edildi. Doğumu takiben prekolostral buzağılardan alınan kan serumlarından 7 tanesi pozitif, 55 tanesi negatif olarak tespit edildi. Doğumdan sonra ortalama 3 ay içinde örneklenen buzağıların kan serumlarının hepsi pozitif olarak tespit edildi. (Tablo 4)

4.7. Pozitif Serumların Serum Nötralizasyon $_{50}$ (SN_{50}) Testi Sonuçları

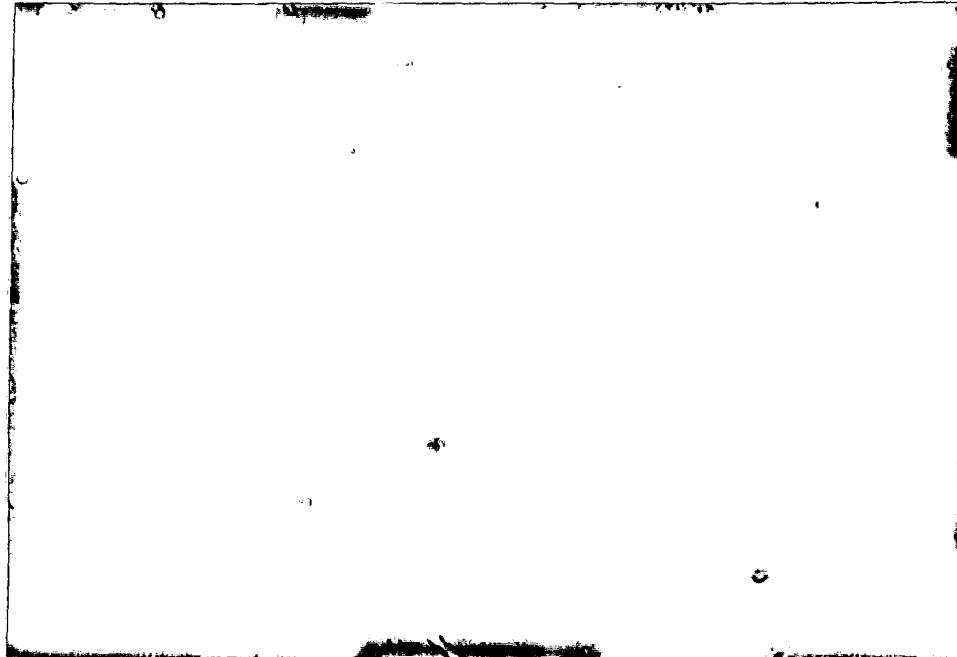
Pozitif olarak tespit edilen hayvanların serumları SN_{50} testine tabi tutuldu. Çalışmada pozitif serumların SN_{50} değerlerinin doğumdan önce örneklenen gebe hayvanlarda $1/7,5 - 1/160 \leq$ arasında, doğum sırasında tekrar örneklenen annelerde $1/7,5 - 1/160 \leq$ arasında, doğum sırasında kolostrum almadan örneklenen buzağılardan pozitif olarak tespit edilen 7 tanesinin de $1/20 - 1/120$ arasında, doğumdan sonra ortalama 3 ay içinde örneklenen aynı buzağılarda ise $1/5 - 1/60$ arasında olduğu tespit edildi. Elde edilen sonuçlar tablo 1, 2, 3 grafik 1 ve grafik 2'de gösterilmiştir.



Resim 1. Fötal Dana Böbrek (FDB) hücre kültürü kontrol (x40)



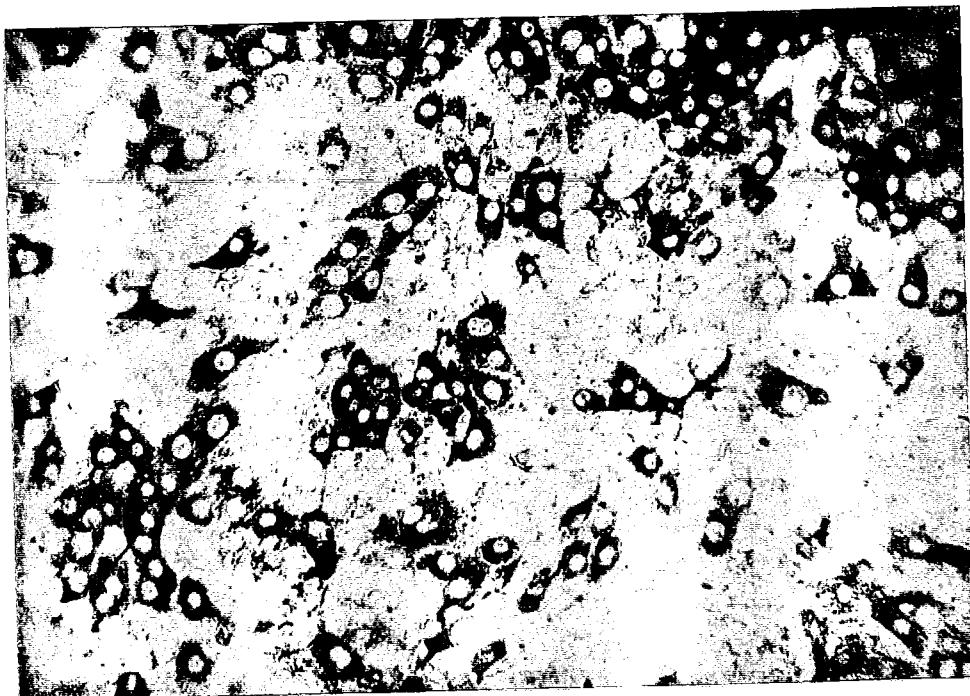
Resim 2. BVDV NADL susunun FDB hücre kültüründe 1. günde meydana getirdiği CPE (x100)



Resim 3. BVDV NADL suşunun FDB hücre kültüründe 3. günde meydana getirdiği CPE (x100)



Resim 4. Floresans mikroskopta BVDV 0712 suşu virus kontrol (x200)



Resim 5. İmmunperoksidaz testinde BVDV 0712 suçu virus kontrol (x200)

Tablo 1. Örneklenen gebe hayvanların ve buzağılarının serum nötralizasyon testi sonucu tespit edilen SN₅₀ değerleri.

HAYVAN NO	DOĞUM ÖNCESİ ANNE	DOĞUM ANI		DOĞUM SONRASI YAVRU
		ANNE	YAVRU	
1	1/160≤	1/80	0	1/80
2	1/160≤	1/160≤	0	1/120
3	1/20	1/40	0	1/40
4	1/160≤	1/120	0	1/60
5	1/10	1/60	1/20	1/60
6	1/160≤	1/160	0	1/120
7	1/160	1/120	0	1/7.5
8	1/20	1/7.5	0	1/5
9	1/15	1/160	1/40	1/120
10	1/160≤	1/160≤	0	1/80
11	1/160≤	1/160≤	0	1/160
12	1/160	1/120	0	1/120
13	1/160≤	1/20	0	1/15
14	1/160≤	1/30	0	1/15
15	1/160≤	1/160≤	0	1/160
16	1/160	1/160≤	0	1/160
17	1/40	1/60	0	1/40
18	1/20	1/20	0	1/15
19	1/30	1/30	0	1/30
20	1/60	1/60	0	1/60
21	1/80	1/160≤	0	1/160
22	1/20	1/60	0	1/20
23	1/120	1/160	0	1/120
24	1/60	1/60	0	1/40
25	1/10	1/160	1/80	1/120
26	1/160	1/80	0	1/80
27	1/160	1/60	0	1/40
28	1/160	1/120	0	1/80
29	1/160	1/160≤	0	1/160
30	1/160≤	1/160≤	0	1/120
31	1/20	1/20	0	1/10
32	1/160	1/60	0	1/60
33	1/7.5	1/60	0	1/60
34	1/40	1/120	0	1/120
35	1/40	1/60	0	1/40
36	1/20	1/7.5	0	1/5
37	1/10	1/160	0	1/80
38	1/20	1/160	0	1/160
39	1/20	1/60	0	1/20
40	1/40	1/120	0	1/120
41	1/160≤	1/160	0	1/160
42	1/160	1/20	0	1/20
43	1/10	1/15	0	1/15
44	1/40	1/60	0	1/60
45	1/160≤	1/160≤	0	1/160
46	1/160≤	1/40	0	1/40
47	1/40	1/120	0	1/60
48	1/20	1/60	1/40	1/40
49	1/7.5	1/20	0	1/15
50	1/10	1/160	0	1/120
51	1/10	1/10	0	1/10
52	1/7.5	1/7.5	0	1/7.5
53	1/10	1/160	1/120	1/160
54	1/10	1/160	0	1/120
55	1/10	1/60	1/20	1/40
56	1/10	1/160	1/80	1/120
57	1/80	1/30	0	1/20
58	1/160≤	1/80	0	1/40
59	1/160≤	1/7.5	0	1/7.5
60	1/160≤	1/160	0	1/160
61	1/160≤	1/30	0	1/10
62	1/160≤	1/40	0	1/20

Tablo 2. Örneklenen hayvanlardan seropozitif bulunan prekolostral buzağıların doğum anı ve ortalama 3 ay içindeki SN_{50} titreleri

Hayvan No	Doğum öncesi anne	Doğum anı		Doğum sonrası yavru
		Anne	Yavru	
5	1/10	1/60	1/20	1/60
9	1/15	1/160	1/40	1/120
25	1/10	1/160	1/80	1/120
48	1/20	1/60	1/40	1/40
53	1/10	1/160	1/120	1/160
55	1/10	1/60	1/20	1/40
56	1/10	1/160	1/80	1/120

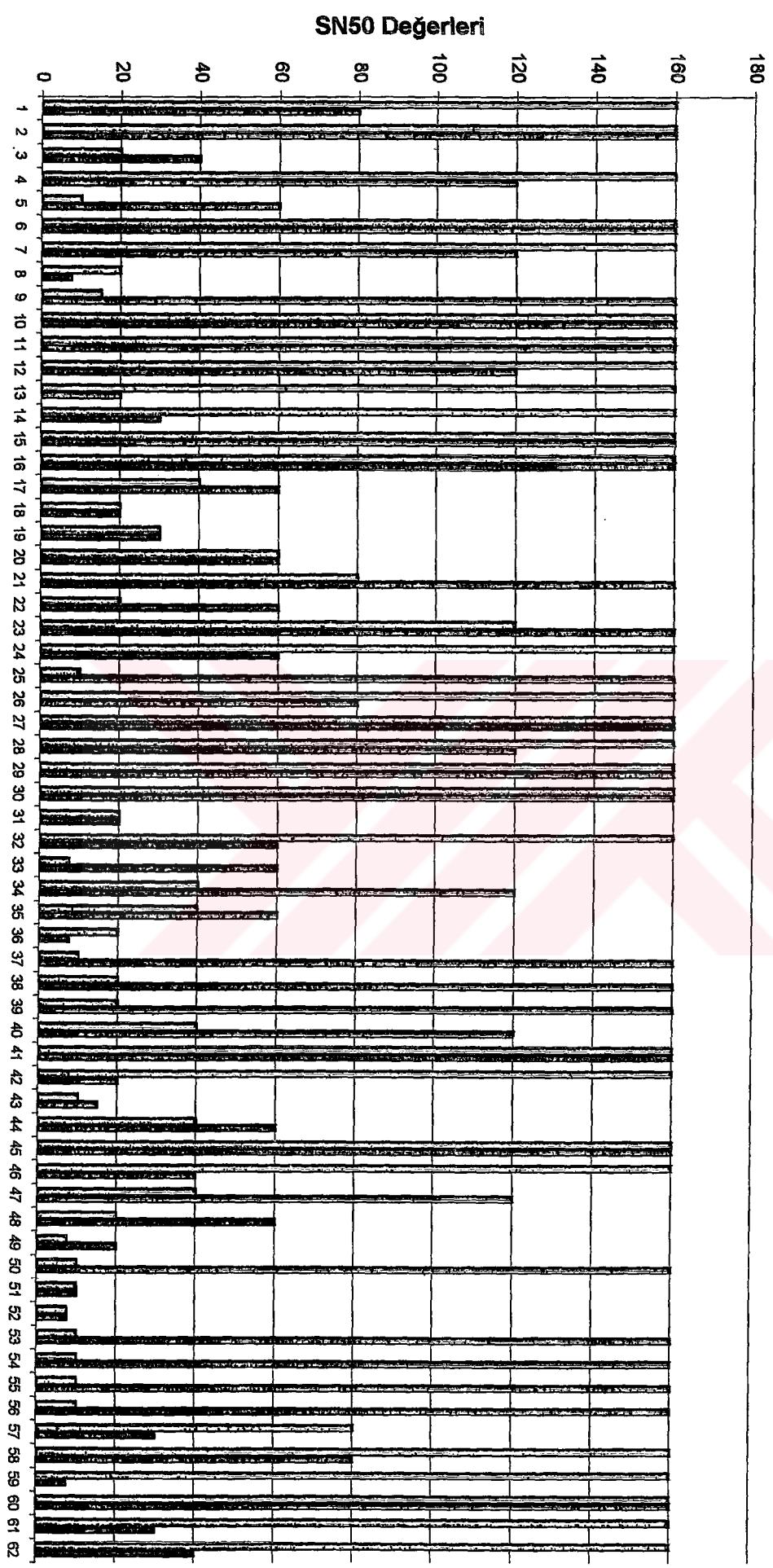
Tablo 3. Doğum Anında Seropozitif Bulunan Buzağıların Ortalama 3 ay İçindeki Örnekleme Zamanları

Hayvan No	Örnekleme Zamanı (Ay)
5	2,5
9	3
25	2
48	1
53	3
55	1,5
56	2

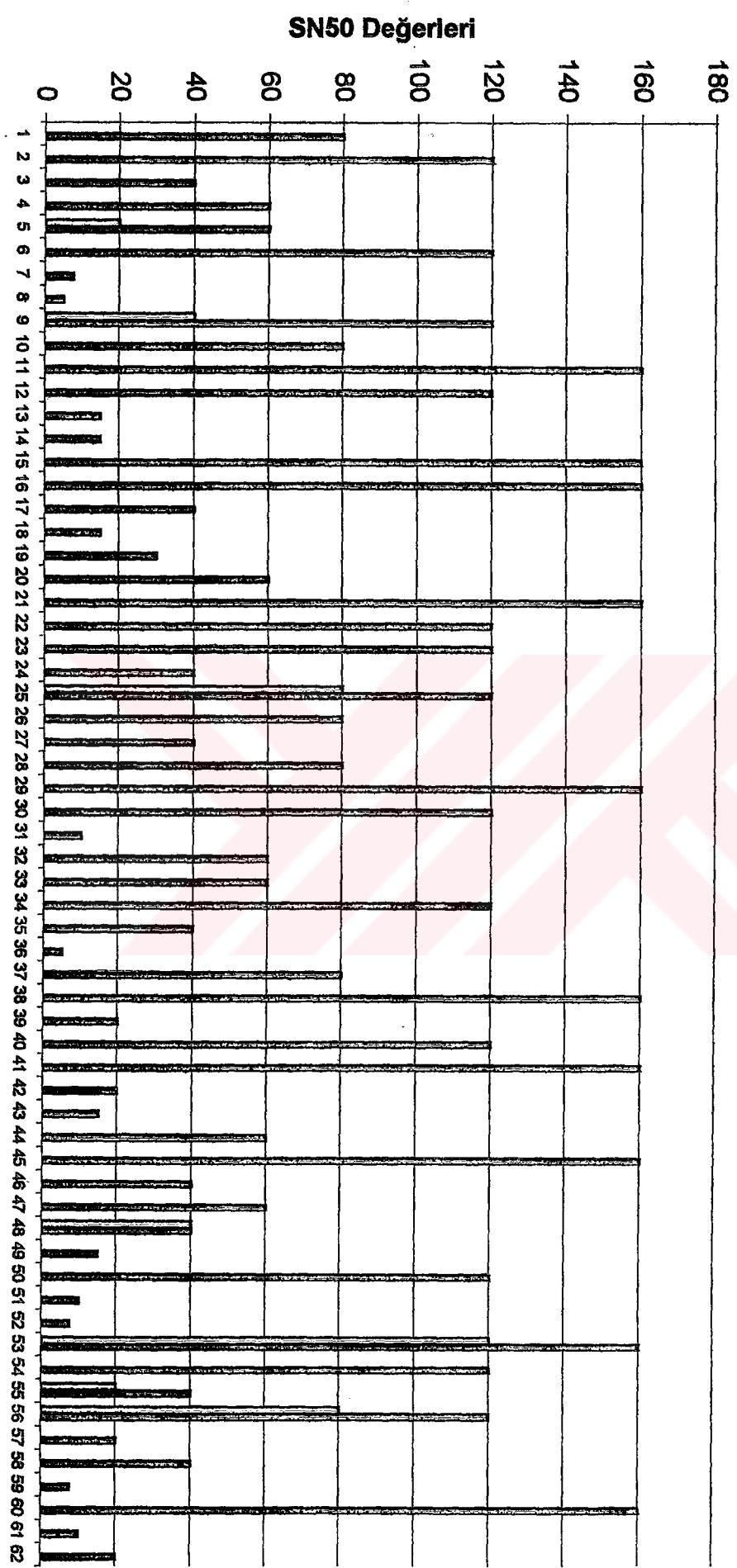
Tablo 4. Doğum Anında Seronegatif Bulunan Buzağıların Ortalama 3 ay İçindeki Örnekleme Zamanları

Buzağı No	Örnekleme Zamanı (Ay)	Buzağı No	Örnekleme Zamanı (Ay)
1	1	32	1.5
2	1.5	33	1.5
3	1	34	2
4	1	35	1
6	1.5	36	1
7	1	37	1
8	1.5	38	3
10	1	39	1.5
11	3	40	1
12	2	41	2.5
13	1	42	1
14	1	43	1.5
15	3	44	2
16	3	45	3
17	1.5	46	1
18	1.5	47	1
19	2	49	1
20	2	50	2
21	2.5	51	1
22	1	52	1.5
23	2	54	2
24	1.5	57	1
26	1.5	58	1
27	1	59	2
28	1	60	3
29	2.5	61	1
30	2	62	1
31	1		

Grafik 1. Doğumdan önce (Anne1) ve doğum anında (Anne2) örneklenen gebe ineklerin SN50 değerleri



Grafik 2. Buzağıların prekostral (Yavru1) ve doğumdan sonra ortalama üç ay içinde (Yavru2) örneklenen kan serumlarının SN50 değerleri.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

BVD-MD tüm dünyada yaygındır ve sığır yetiştirciliğinde önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Grooms ve ark. 1998, Radostits ve Littlejohns 1988). Enfeksiyon; depresyon, ateş, hafif diyare, geçici leukopeni ile karakterizedir (Radostits ve Littlejohns 1988).

BVDV'unun ncp biyotipi ile gebeliğin çeşitli dönemlerinde enfekte olan seronegatif gebe sığırlarda virus fótusu gebeliğin dönemine bağlı olarak çeşitli şekillerde etkileyebilmektedir. Oluşan fótal lezyonlar, konjenital anomaliler (Kahrs ve ark. 1980, Duffel ve Harkness 1985, Baker 1987, Brownlie ve ark. 1998) abort (Casaro ve ark. 1971, Baker 1987, Moennig 1990, Carman ve ark. 1998) mumifikasyon (Moermann ve ark. 1994, Weiss ve ark. 1994, Liess 1990) beyin ve göz lezyonları (Straver ve ark. 1983, Jubb ve ark. 1985, Hewicker-Trautwein ve Trautwein 1994, Hewicker-Trautwein ve ark. 1995, Hewicker-Trautwein ve ark. 1995) ve persiste enfekte buzağı doğum (Liess 1985, Moenning 1990, Liess 1990, Moermann ve ark. 1994, Weiss ve ark. 1994, Bruschke ve ark. 1998) olarak ifade edilmektedir.

BVDV'unun ncp biyotipi ile gebeliğin 120. gününden önce yani fótus henüz antijeni tanıယacak düzeyde yeterli immun yanıt oluşturma yeteneğine sahip değilken enfekte olan hayvanlar, persiste enfekte buzağılar dünyaya getirmekte ve bu hayvanlar ömür boyu virus kaynağı olarak sürüler için enfeksiyon riski oluşturmaktadır. Bu pozisyondaki buzağılar yaşamlarının ilerleyen dönemlerinde annelerinden aldıkları ncp biyotipin homologu cp bir biyotiple enfekte olurlarsa, MD gelişebilmekte ve kısa süre içinde ölebilmektedirler (Schultz 1973, Brownlie ve ark. 1987, Deregt ve Loewen 1995, Thur ve ark. 1997).

Gelferd (1991), Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde BVDV'u üzerine yaptığı bir çalışmada bölge sığırlarının BVDV'a karşı oluşan antikor yönünden pozitifliklerini ortalama %74 olarak belirlediğini ifade etmiştir.

Alkan (1989), artrogrippotifoza ve hidranensefali'li buzağılarda BVDV'unun rolü üzerine yapmış olduğu çalışmada, BVDV'unun artrogrippotifoza ve hidranensefali'li buzağıların doğumundan sorumlu olabileceğini bildirmiştir.

Özkul (1992), gebe sığırlarda ve bunların buzağılarında BVDV'unun transplasental enfeksiyonu sonucu oluşan etkiler hakkında yapmış olduğu çalışmada, BVDV'unun transplasental aktarımını ve fótusun çeşitli organlarına (böbrek, dalak, akciğer) yerleşen virusun抗jenlerini tespit ederek, BVDV enfeksiyonun anneden fótusa bulaştığını rapor etmiştir.

Şimşek (1994), BVDV ile persiste enfeksiyon araştırmak üzere test ettiği 142 adet sağlıklı hayvandan elde ettiği lökosit numunelerini DIFT ile kontrol ederek 2 adet akut enfeksiyon belirlediğini bildirmiştir.

Araştırmada özel bir süt sığırı işletmesinde bulunan çeşitli gebelik dönemlerindeki, 62 adet sığirdan virus izolasyonu amacıyla EDTA'lı tüplere, antikor tespiti için normal tüplere kan örnekleri alındı. Gebelik süreleri boyunca işletme veterinerleri ile komunikasyon sağlanarak hayvanların klinik durumları ve abort olup olmadığı konusunda bilgi alındı. Aynı hayvanların doğumları sırasında hem anne hem de prekolostral buzağılardan virus izolasyonu amacıyla EDTA'lı tüplere, antikor tespiti için de normal tüplere kan örnekleri alındı. Konjenital anomalili ya da normalden zayıf buzağıların olup olmadığı kontrol edildi. Annelerden ikinci örneklemenin amacı birinci örneklemeye sırasında virus ya da antikor negatif bir hayvan varsa bu durumun doğum anına kadar devam edip etmediğini tespit etmekti. Prekolostral buzağıları örneklemenin amacı ise eğer varsa seronegatif annelerin BVDV'unun ncp biyotipi ile enfekte olması halinde fötusa olan etkileri, fötusun immunolojik durumuna göre oluşturacağı antikorları belirlemekti. Buzağılardan ortalama 3 ay içinde tekrar hem virolojik hem de serolojik amaçlı kan örneklerinin alınmasının sebebi ise doğumdan sonra ortalama 3 ay içinde hayvanların virus yönünden tetkiki ve kolostrum almadan önce ve aldıkten sonra antikor titrelerinin tespiti ve karşılaştırılmasıdır.

Çalışmada BVDV'unun FDB hücre kültürlerindeki antijen varlığını belirlemek amacıyla DIF ve DPLA testleri kullanılmıştır. Çeşitli araştırmacılar (Meyling 1984, Anjaria 1985, Kotwal ve ark. 1985, Alkan ve Burgu 1993, Burgu ve Özkul 1993, Karaoğlu 1996, BVDV'nu araştırmak üzere DIF ve DPLA testlerini kullanarak yaptıkları çalışmalarla her iki testin de paralel sonuçlar verdiği ifade etmişlerdir.

Meyling (1984), çalışmasında BVDV'u izole etmek amacıyla 132 adet lökosit örneklerini DIF ve PLA testlerine tabi tutmuş ve her iki test ile kontrol ettiği örneklerden 126 tanesinin pozitif olduğunu bildirmiştir, DIFT ve PLA'nın birbiri ile uyumlu testler olduğunu ifade etmiştir.

Anjaria (1985), kuduz virusunu kullanarak yaptığı çalışmasında DIFT ve DPLA'nın paralel sonuçlar verdiği bildirmiştir. Benzer bir çalışma Kotwal ve ark (1985) tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar kuduzun teşhisi amacıyla DPLA, DIFT ve Sellers boyama yöntemlerini kullanmışlardır, DIFT ve DPLA'nın Sellers boyama yönteminden daha duyarlı olduğunu ifade ederek DIFT'ndeki uygulama ve değerlendirme dezavantajlarından dolayı DPLA testinin DIFT'nin yerini alabileceğini belirtmişlerdir.

Karaoglu (1996), sindirim veya solunum sistemi enfeksiyonu semptomları gösteren 183 adet sığır ait gaita, lökosit ve serum numunelerinin hücre kültürü pasajları sonucunda elde edilen 1. pasaj sıvılarını DPLA testine tabi tutmuş ve 3 adet lökosit numunesinden BVDV抗igenini tespit ettiğini bildirmiştir. Aynı araştırmacı bu 3 numunenin 1. pasaj sıvılarını DIF testine tabi tutarak aynı sonuçları elde ettiğini ifade etmiştir. Karaoglu (1996), aynı çalışma içinde daha önceden Alkan ve Burgu (1993) tarafından DIF testi ile antijen pozitif olarak tespit edilen 5 izolata ve Burgu ve Özkul (1993) tarafından yine DIF testi ile antijen pozitif olarak tespit edilen 12 izolata DPLA testi uygulayarak aynı sonuçları elde ettiğini ifade etmiştir.

Çalışmada BVDV'u tespit etmek amacıyla gebeliğin çeşitli dönemlerindeki 62 adet inekten, aynı hayvanların doğumları sırasında hem anne hem de prekolostral buzağılardan ve doğumdan sonra ortalama 3 ay içinde aynı buzağılardan tekrar alınan toplam 248 adet lökosit numunesinin FDB hücre kültüründe gerçekleştirilen pasajı sonucunda elde edilen 1. pasaj sıvılarının DIFT'ne tabi tutulmaları sonucu virus antijen varlığı belirlenememiştir. Aynı numuneler DPLA testine tabi tutularak DIFT'ne paralel sonuçlar elde edilmiştir. Hem DIFT hem de DPLA testinin uygulanması sırasında virus kontrol olarak ayrılan gözlerde pozitif sonuçlar elde edilmiş, hücre kontrol olarak ayrılan gözlerde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

Özkul (1992), 50 adet gebe inek ve fötuslarında yaptığı çalışmasında sadece 1 anneye ait lökosit numunesini BVDV抗igeni yönünden pozitif olarak değerlendirmiştir. Araştırmacı (1992), bu annenin örneklemesi sırasında akut-geçici veya persiste bir vireminin varlığını gösterebileceğini ifade etmiş, örneklenen hayvanların kısa sürede kesilmeleri nedeniyle ikinci kez örneklemeye yapılamaması akut veya persiste bir enfeksiyonun sonucu olup olmadığıın belirlenememesine neden olduğunu bildirmiştir. Özkul (1992)'un bulguları ışığında çalışmada doğumdan önce ve doğum takiben örneklenen annelerin BVDV抗igeni yönünden negatif olarak tespit edilmesinin nedeni hayvanları örneklemeye sırasında akut-geçici ya da persiste bir enfeksiyona sahip olmamalarından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Alkan (1989), tarafından yapılan bir çalışmada 6'sı kör buzağılara, 4'ü kör buzağıların annelerine ait lökosit örneklerinde olmak üzere 10 adet cp BVDV, biri kör bir buzağıya, diğer ikisi ise abort yapmış ve kör buzağı doğurmuş annelere ait lökosit örneklerinde olmak üzere 3 adet ncp BVDV izole etmiştir. Alkan (1989), çalışması dahilinde örneklediği ve BVDV抗igeni yönünden negatif olarak tespit ettiği 15 ve 28 nolu annelerin antikor titresini sırasıyla <1/5 ve 1/160 olarak tespit etmiştir. Her iki anneye ait

buzağı BVDV antijeni yönünden pozitif olarak tespit edilmiştir. Annelerin gebeliğin erken dönemlerinde yani fötus henüz immunkompetans değilken virusla enfekte oldukları araştırcı tarafından ifade edilmiştir.

Bu çalışmada annelerin antikor titrelerinin oldukça yüksek olması ve doğum takiben prekolostral buzağılardan yapılan örneklemenin virus negatif olması annelerin virusla gebelikten önce enfekte olduklarını göstermektedir. Gebelik sırasında virusla ikinci kez karşılaşsalar bile birinci enfeksiyonu takiben gelişen nötralizan antikorlar hayvanları enfeksiyona karşı koruyacak ve gebeliğin erken döneminde bile olsa virusun fötusa geçişi engellenecektir. Doğumu takiben buzağıların annelerinden aldıkları kolostrumla maternal antikorlar buzağılara aktarılmış ve örneklemme süresi içinde – ortalama 3 ay – bu antikorlar buzağıları BVDV enfeksiyonuna karşı korumuştur.

Bu çalışmada BVDV'una karşı oluşan antikorları belirlemek amacıyla SN testi kullanılmıştır.

Houe ve Meyling(1991) Danimarka'da 19 sütçü sığır sürüsünde 2570 adet serum örneği toplamışlar ve tüm hayvanların %60'ından fazlasının BVDV yönünden seropozitif olduğunu bildirmiştir. Bolin ve ark.(1985) 66 sürüden topladıkları 3157 sığır serum örneğine uyguladıkları SN testi sonucunda %89 oranında seropozitif hayvan tespit ettilerini ifade etmişlerdir.

Çalışmada, örneklenen sürüdeki gebe annelerin BVDV yönünden SN testi ile antikor taramaları sonucu bütün gebe anneler BVDV yönünden seropozitif olarak belirlenmiştir. Doğumdan önce örneklenen 62 adet gebe inegin SN testi sonucunda antikor titrelerinin $1/7,5 - 1/160 \leq$ arasında değiştiği tespit edilmiştir. Tüm hayvanların seropozitif olması işletmedeki hayvanların, diğer enfeksiyonlara karşı hazırlanan doku kültürü aşılıyorla aşılanması, nazal akıntı, suni tohumlamada kullanılan spermalar, idrar, gaita, gözyaşı akıntısı, kan, süt, kan emici sinekler, veteriner hekimler ve kullandıkları malzemeler v.s. vektörlerden herhangi birisi ile kontamine olduğunu göstermektedir.

SN testi, BVDV'una karşı oluşan antikorları belirlemek amacıyla çeşitli araştırcılar tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır. Alkan (1989) tarafından yapılan çalışmada pozitif bulunan serumların büyük bir kısmı 1/40 ve daha yüksek oranlarda nötralizan aktivite göstermiştir. Gelferd (1991) tarafından Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde yapılan bir çalışmada, BVDV yönünden seropozitif olan hayvanların(1/40 ve üzeri antikor içeren) ortalaması %74 olarak belirlenmiştir. Özkul (1992), yaptığı çalışmada seropozitif olarak belirlediği 40 adet hayvandan 35 tanesinde nötralizan antikor titresini 1/30 ve daha yüksek olarak belirlediğini ifade etmiştir. Şimşek (1994), seropozitif olarak

belirlediği 113 hayvanın 73 adedindeki nötralizan antikor titresini 1/39,8 ve daha yüksek oranlarda olduğunu tespit etmiştir. Karaoğlu (1996), Ceyhan ve Acıpayam'daki kapalı işletmelerde örneklenen sığırların tamamını (%100) seropozitif olarak belirlerken, Akyurt'taki özel işletmeden örneklediği hayvanların %89,5'ini, Çubuk mezbahasında örneklenen sığırların ise %92,5'ini seropozitif olarak belirlediğini ifade etmiştir. Bu araştırmada ise; 62 adet gebe anneden %100 oranında seropozitiflik tespit edilirken 35'inin 1/40 ve üzerinde antikor titresi gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada annelerde tespit edilen antikor titreleri Türkiye'de daha önce BVDV'u üzerine yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Çalışmada doğum takiben hemen örneklenen prekolostral buzağılardan büyük bir kısmı seronegatif olarak tespit edilmiştir. Prekolostral buzağılardan seropozitif olan 7 adedinin antikor titreleri 1/20-1/120 arasında tespit edilmiştir (Tablo 2). Casaro ve ark (1971), gebeliğin çeşitli dönemlerinde bulunan 26 sığırla yaptıkları bir çalışmada gebeliğin 168. gününden daha sonraki dönemlerde bulunan 5 adet fötusu intraperitoneal ya da intramuskuler yolla direkt olarak BVDV'ü ile enfekte ettiklerini ve fötuslardan 1 tanesinde antikor gelişmezken 4 tanesinde tespit edilen antikor titrelerinin gebeliğin 190. günündeki fötusta 1/3, 240. günündeki fötusta 1/1.450, 210. günündeki fötusta 1/2.048, 280. günündeki fötusta 1/4.096 olduğunu belirtmişlerdir.

Classick ve Fernelius (1970), gebeliğin son döneminde bulunan 4 yaşlı bir seronegatif sığırı BVDV'ü ile enfekte etmişler, doğum takiben prekolostral buzağıdan aldıkları serum örneğinde yüksek titrede nötralizan antikor tespit ettiklerini bildirmiştir.

Brown ve ark (1979), 32 adet gebe sığırı gebeliklerinin 150. ve daha önceki günlerinde BVDV'ü ile enfekte etmişler ve cerrahi yöntemlerle fötusları elde etmişlerdir. Araştırmacılar 150. günde enfekte ettikleri 4 adet buzağının sezeryan ile alım günlerini ve oluşan nötralizan antikor titrelerini aşağıdaki gibi belirtmişlerdir:

Sezeryan Günü	Antikor Titresi
206	1/128
219	1/256
232	1/32
290	1/64

Kendrick (1971), gebeliğin 40–235. günlerinde BVDV'ü ile enfekte edilen sığırlardan doğan buzağılara ait 17 prekolostral serum numunesinin 12 tanesinde nötralizan

antikor belirlemiştir. En erken nötralizan antikor oluşturma süresini Kendrick (1971) 93. gün olarak , Casaro ve ark. (1971) 168. gün olarak belirlediklerini ifade etmişlerdir.

Orban ve ark (1983), gebeliğin 190–265. günleri arasında bulunan seronegatif 36 adet sığırı canlı BVDV aşısı ile aşıladıktan sonra doğan buzağılardan kolostrum almadan önce serum örnekleri alarak 34 tanesinde 1/80 ile 1/216 titre arasında nötralizan antikorlar tespit ettilerini bildirmiştirlerdir. Araştırmacılar 2 adet buzağıda BVDV'una karşı antikor tespit edememişler, buzağıların annelerini doğumdan 64 – 73 gün önce aşıladıkları için aşı virusunun plasentayı geçmediğini kabul etmişlerdir. Aynı araştırmacılar seropozitif olan 48 adet gebe sığırı canlı BVDV aşısı ile aşılamışlar ve buzağıların 44 tanesinde nötralizan antikor belirlenemezken, 4 tanesinde 1/20 – 1/180 titrede nötralizan antikorlar tespit ettilerini ifade etmişlerdir.

Yukarıda bahsedilen BVDV'unun gebe anneden fötusuna geçişile ilgili çalışmalar (Classick ve Fernelius 1970, Kendrick 1971, Casaro ve ark. 1971, Brown ve ark. 1979, Orban ve ark. 1983) gebeliğin 120. gününden sonra gelişen fötal immun cevabının sonucu olarak, sezeryanla alınan ya da normal doğan buzağılardan yapılan prekolostral örneklemelerle fötusun immun yeteneğine ve virus miktarına bağlı olarak çeşitli oranlarda antikor titreleri tespit edilmiştir. Bu araştırma ile , Brown ve ark.(1979) ve Casaro ve ark.(1971)'nın yaptıkları çalışmalar örnekleme zamanı olarak paralellik göstermesine rağmen fötusların antikor titreleri farklı oranlarda tespit edilmiştir. Orban ve ark.(1983)'nın 48 adet seropozitif gebe sığırı yaptıkları çalışma sonucunda doğan 4 adet seropozitif buzağıdan prekolostral örneklemeyle elde ettikleri antikor titreleri ile (1/20 – 1/180) bu çalışmada 7 adet seropozitif prekolostral buzağıda tespit edilen antikor titreleri (1/20 – 1/180) uyumlu bulunmuştur.

Çalışmada doğum takiben 3 ay içinde örneklenen buzağıların hepsinin seropozitif olması kolostrumla aktarılan maternal antikorlara bağlıdır. Doğumdan önce ve doğum sırasında antikor titreleri yüksek olan annelerin -kolostrumla aktarılan maternal antikorlara bağlı olarak- buzağılarının da antikor titreleri yüksek bulunmuştur. Palfi ve ark (1993). yaptıkları bir çalışmada, 11 adet persiste enfekte buzağı ve 1 adet immunkompetans buzağıyı BVDV'u ve BVDV antikorları yönünden araştırmışlardır. Araştırmacılar persiste enfekte buzağıların hepsinde virus tespit ederken immunkompetans buzağıda virus tespit edemediklerini bildirmiştirlerdir. 20 hafta süren araştırma periyodunda immunkompetans buzağıının antikor titresi 1/1024 olarak belirlenirken 4. haftada 1/512, 8. haftada 1/96, 12. haftada 1/48, 18. haftada ise 1/32 olarak belirlediklerini ayrıca maternal antikorların buzağıyı 18 hafta boyunca koruduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışmada

kolostrum aldıktan sonra örneklenen buzağıların antikor titreleri 1/5-1/160 arasında tespit edilmiştir. Doğum anında seropozitif bulunan buzağıların örneklenme zamanları Tablo 3'te gösterilmiştir.

Yapılan çalışmada doğum takiben kolostrum alan buzağılardan ilk 3 ay içinde belirlenen nötralizan antikor titrelerinde maternal antikorların rolü büyütür. Bu anlamda elde edilen sonuçlar Palfi ve arkadaşlarının çalışması ile paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada, gebe sığırların BVDV'yu yönünden virolojik ve serolojik tetkikleri ile gebelik dönemine bağlı olarak enfeksiyonun fötusa aktarılması ve fötusun yaşına bağlı olarak gösterdiği tepkilerin ve oluşan anormalliklerin saptanması, doğum takiben prekolostral örneklemelerle buzağıların -annelerin etkilenme yaşlarına göre serolojik ve virolojik pozisyonları incelenerek ilk 3 ay içindeki durumları belirlenmiştir. Doğum anında seronegatif bulunan buzağıların örneklenme zamanları Tablo 4'de gösterilmiştir. Yüksek antikor titresine sahip annelerden doğan seronegatif buzağıların doğum takiben ilk 3 ay içindeki örneklemelerinde tespit edilen antikor titreleri annelerinden aldıkları, kolostrumla geçen maternal antikorlara bağlı olarak 1/5-1/160 titrelerinde tespit edilmiştir. Buzağılardan 24'ü doğum takiben ilk 1 ay, 12'si ilk 1.5 ay, 10'u ilk 2 ay, 3'ü ilk 2.5 ay ve 6'sıda 3. ayda örneklenmiştir. Yüksek antikor titresine sahip annelerin buzağılarında antikor titreleri yüksek bulunmuştur. Doğumdan sonra ilk 3 ay içinde örneklenen buzağıarda viral抗原lerin belirlenememesi, buzağıların bu süre zarfında BVDV'yu ile enfekte olsalar bile kolostrumla aldıkları maternal antikorlar tarafından korunmalarına bağlanmıştır.

Toplam 248 adet numune BVDV'yu tespit etmek üzere DIF ve DPLA testleri kullanılarak test edilmiştir. Testlerin sonucunda virus izole edilememiştir. BVDV'una karşı oluşan antikorları tespit etmek amacıyla uygulanan SN testi sonucunda annelerde her iki örneklemde de %100 seropozitiflik tespit edilmiştir.

Doğum anında seropozitif olarak tespit edilen 7 adet buzağının annelerinin doğum öncesi örneklemelerinde antikor titreleri (1/10-1/20) arasında tespit edilmiştir. Seropozitif olan buzağıların annelerinin ilk örneklemesi gebeliğin 6.-6,5. aylarında gerçekleştirılmıştır. Yedi annenin gebelikleri esnasında gerçekleştirilen örneklemelerinde antikor titreleri düşük seviyede tespit edilmesine rağmen doğum anında gerçekleştirilen 2. örneklemde antikor titreleri oldukça yüksek (1/60-1/160) bulunmuştur. Bu sonuç; 7 adet buzağının annelerinin gebelikten daha önce BVDV'yu ile enfekte olduklarını ve birinci örneklenme anına kadar nötralizan antikor seviyelerinin düşüğünü göstermektedir. Doğum anında tekrar örneklenen annelerin antikor seviyelerinin birinci örneklemeye göre yüksek bulunması bu

iki periyot arasında BVDV'u ile tekrar enfekte olduklarını göstermektedir. Birinci örneklem esnasında düşük antikor seviyesine sahip 7 adet annenin reenfeksiyonu sonucu virus plasentayı geçerek fötusa ulaşmıştır. Gebeliklerinin 6. – 6.5. aylarında örneklenen bu annelerin buzağılarının immun sistemi antikor oluşturabildiği için 7 adet buzağı seropozitif olarak doğmuştur. 7 adet buzağının prekolostral örneklemeleri yapılarak SN testi uygulanmış ve antikor titreleri 1/20 – 1/120 oranında tespit edilmiştir. Prekolostral örneklemelerinde seropozitif olan 7 adet buzağının kolostrum alındıktan sonraki ortalama 3 ay içindeki örneklemeleri sonucu antikor titreleri 1/60 – 1/120 oranında tespit edilmiştir. Buzağıların nötralizan antikor seviyesindeki artış kolostrumla annelerinden aldığı maternal antikorlarca sağlanmıştır.

Doğum anındaki örneklemelerinde seronegatif olan buzağıların annelerinin büyük bir bölümünün gebelik dönemindeki ilk örneklemelerinde yüksek antikor titresine sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu hayvanlar BVDV'u ile reenfeksiyona maruz kalsalar bile var olan antikor seviyeleri virusu elemine eder ve fötusa geçmesine izin vermez. Virus fötusa ulaşamadığı için buzağı seronegatif olarak doğar. Birinci örneklemelerinde düşük antikor titresine sahip annelerin 2. örneklemelerinde belirlenen yüksek antikor seviyeleri annelerin immun sistemleri ile ilgilidir. Zira bu annelerin prekolostral buzağıları SN testi ile seronegatif olarak tespit edilmiştir. Buzağılardan hiç birisinde viral antijen ve nötralizan antikor belirlenmemiştir. Bir reenfeksiyon söz konusu değildir.

Bu çalışmanın amacı pesiste enfeksiyonu tespit etmek olduğundan gebe hayvanların büyük bir bölümü gebeliklerinin ilk 3. - 3,5. aylarında örneklenmiştir. Bununla birlikte örneklemesi gebeliklerinin 6. - 6,5. aylarına kadar uzayan hayvanlar mevcuttur. Gebeliğin erken dönemlerinde örneklemenin amacı fötusların immun sistemlerinin yaklaşık 120. günden sonra gelişmesi ve antikor oluşturabilmesidir. İmmun sistemleri gelişmemiş olan fötuslar antikor oluşturamaz, virusu yabancı olarak tanımadır ve seronegatif olarak doğar.

Seronegatif yada seropozitif doğan tüm buzağılar kolostrum alındıktan sonra maternal antikorlarca BVDV enfeksiyonuna karşı korunmuşlardır. Ortalama 3 ay içindeki örneklemde seronegatif buzağıların antikor seviyeleri annelerinden aldığı maternal antikor titresine bağlı olarak 1/7,5 – 1/160 olarak tespit edilmiştir. Persiste enfeksiyonları ve fötusun yaşına bağlı olarak virusun fötus üzerine etkilerini belirlemek üzere gerçekleştirilen bu çalışmada annelerin ve yavruların antikor düzeyleri de değerlendirilerek tartışılmıştır. Pasif immunitede maternal antikorların önemi vurgulanmıştır.

Persiste enfekte hayvanlar sığır yetiştirciliğinde sürekli bir enfeksiyon kaynağı olmaktadır. Süri içindeki gebe hayvanlara da virusu bulaştırılmaktır ve transplasental

enfeksiyonlar sonucu gebeliğin dönemine bağlı olarak fötusu çeşitli şekillerde etkileyebilmektedirler. BVDV' u ile mücadelede sürüdeki PI hayvanlar belirlenerek sürüden uzaklaştırılmalıdır. Özellikle büyük sürülerde tüm hayvanlardan tek tek virus izole etmeye çalışmak zahmetli ve uzun süreli bir yöntemdir. Bu yüzden hayvanların serolojik olarak taramasıyla seronegatif hayvanlar tespit edilmelidir. Seronegatif hayvanlar sürüden ayrılmalı ve BVDV antijeni yönünden sürekli kontrol edilmelidir.



6. ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Viroloji Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ / KONYA - 1999

Orhan YAPKIÇ

Danışman
Doç. Dr. Sibel YAVRU

Gebe Sığırlarda ve Bunların Buzağılarında Persiste Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Enfeksiyonunun İmmunfloresan ve İmmunperoksidaz Testleri ile Araştırılması

Araştırmada, özel bir işletmede bulunan 62 adet gebe inek doğumdan önce, doğumları sırasında hem inek hem de prekolostral buzağılardan ve doğumdan sonra ortalama 3 ay içinde buzağılardan virus izolasyonu amacıyla EDTA'lı tüplere, serolojik amaçla normal tüplere kan örnekleri alındı.

Lökosit numunelerinden virus izolasyonu amacıyla direkt immunfloresan (DIF) ve direkt immunperoksidaz (DPLA) testleri kullanıldı. BVDV'una karşı oluşan antikorların tespit edilmesi amacıyla serum nötralizasyon (SN) testi kullanıldı.

Gebe ineklerin ve buzağıların tümü birinci ve ikinci örneklemelerde BVDV抗jenleri yönünden negatif olarak tespit edildi.

BVDV'una karşı oluşan antikorları tespit etmek için uygulanan SN testi sonucunda gebe ineklerin tümü birinci ve ikinci örneklemelerde pozitif bulunurken, prekolostral buzağılardan 7 adedi pozitif, 55 adedi negatif, buzağıların doğumdan sonra ortalama 3 ay içinde gerçekleştirilen ikinci örneklemesinde ise tümü pozitif olarak tespit edilmiştir.

Doğumdan önce örneklenen gebe annelerin SN_{50} titreleri $1/7,5 - 1/160 \leq$ arasında. doğum sırasında örneklenen annelerin SN_{50} titreleri $1/7,5 - 1/160 \leq$ arasında tespit edildi. Doğumu takiben örneklenen ve seropozitif bulunan 7 adet prekolostral buzağının SN_{50} titreleri $1/20 - 1/120$ arasında, doğumdan sonra ilk 3 ay içinde örneklenen buzağıların SN_{50} titreleri $1/5 - 1/160$ arasında tespit edildi.

7. SUMMARY

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Viroloji Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ/KONYA-1999

Orhan YAPKIÇ

Danışman
Doç.Dr.Sibel YAVRU

Investigation of Persistant Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Infection at the Pregnant Cows and Their Calves by Immunoflourescence and Immunperoxidase Tests

Blood samples which were collected with or without EDTA were taken from 62 prenatal pregnant cows, from both cows and precolostral calves at the time of birth and, within approximately 3 months, from postnatal calves which were all present in a private management in this research.

Direct immunoflourescence (DIF) and direct immunperoxidase (DPLA) tests were used aiming virus isolation from leucocyte samples, serum neutralisation test was used to detect antibodies against BVDV.

No viral antigen was detected in terms of BVDV from first and second blood samples obtained both all pregnant cows and all calves.

By SN testing which was used to detect antibodies against to BVDV, while all the pregnant cows were found to be positive after both sampling, 7 precolostral calves were positive and 55 precolostral calves were negative all the calves, from which the second sampling was carried out approximately during 3 months after birth, were detected as positive.

SN₅₀ titers of the pregnant cows from which sera samples were collected before birth were noted between 1/7,5 and 1/160≤. However, SN₅₀ titers of sera taken from cows just after giving birth were detected between 1/7,5 and 1/160≤. The sera samples obtained from 7 precolostral – seropositive calves immediately following birth, SN₅₀ titers were found to be between 1/20 and 1/120. The samples taken from calves within 3 months after birth SN₅₀ titers were detected between 1/5 and 1/160.

8. KAYNAKLAR

Alenius S, Jacobson SO and Cafaro E (1986) Frequency of bovine viral diarrhea virus infections in Sweden among heifers for artificial insemination, Proc 14th World Cong Dis of Cattle 204-206.

Alkan F (1989) Arthrogrippothypossa ve hydranencephaly'lı buzağı doğumlarında bovine viral diarrhea buzağı doğumlarında bovine viral diarrhea-mucosal disease (BVD-MD)'in insidensi üzerinde araştırmalar, A Ü Sağ Bil Enst, Doktora tezi, Ankara.

Allan GM, Mc Nulty NS, Bryson D, Mackie D and Platten M (1989) Demonstration of bovine virus antigen in formalin fixed, paraffin embedded tissue using a streptavidin/biotin technique, Res Vet Sci 46, 416-418.

Anjaria JM and Jhala CI (1985) Immunperoxidase reaction in diagnosis of rabies, Int J Zoon 12, 267-275

Archbald LF, Gibson GD, Schultz RH, Fahning ML and Zemjanis R (1973) Effects of intrauterine inoculation of bovine viral diarrhea-mucosal disease virus on uterine tubes and uterus of nonpregnant cows, Minnesota Agricultural Experiment Station 1133-1137, September.

Archbald LF and Zemjanis R (1977) Intrauterine infusion of the virus of BVD and artificial insemination in the cow at oestrus, Vet Med Small Anim Clin 221-225, February.

Baker JC (1987) Bovine viral diarrhea virus: A review, JAVMA 190 (11) 1449-1458.

Bezek DM, Baker JC, and Kaneene JB (1988) Immunofluorescence of bovine virus diarrhea viral antigen in white blood cells from experimentally infected immunocompetent calves, Can J Vet Res 52: 288-290.

Bezek DM, Gröhn YT and Dubovi EJ (1994) Effect of acute infection with non-cytopathic or cytopathic bovine viral diarrhea virus isolates on bovine platelets, Am J Vet Res 55 (89), 1115-1119 August.

Binkhorst GJ, Journee DLH, Wouda W, Straver PJ and Vos JH (1983) *Neurological disorders, virus persistence and hypomyelination in calves due to intrauterine infections with bovine virus diarrhoea virus*, I. Virology and Epizootiology. Vet Q 5 (4) , October.

Bock RE, Burgess GW and Douglas IC (1986) *Development of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of bovine serum antibody to bovine viral diarrhoea virus*, Aust Vet J 63, 406-408.

Bolin SR and Ridpath JF (1990) *Range of viral neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhea virus vaccines*, Am J Vet Res 51 (5), 703-707.

Bolin SR, Mc Clurkin AW and Coria MF (1985) *Frequency of persistent bovine viral diarrhea virus infection in selected herds*. Am J Vet Res 46 (11), 2385-2387.

Bolin SR, Mc Clurkin AW, Cutlip RC and Coria MF (1985) *Response of cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus to vaccination for bovine viral diarrhea and to subsequent challenge exposure with cytopathic bovine viral diarrhea virus*, Am J Vet Res 46 (12), 2467-2470.

Bolin SR, Mc Clurkin AW, Cutlip RC and Coria MF (1985) *Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhea virus*, Am J Vet Res 46 (3), 573-576, March.

Braun RK, Osburn BI and Kendrick JW (1971) *Immunologic response of bovine viral diarrhea virus*, Am J Vet Res 34 (9), 1127-1931.

Brinkhof J, Zimmer G and Westenbrink F (1996) *Comparative study on four enzyme-linked immunosorbent assays and a cultivation assay for the detection of antigens associated with the bovine viral diarrhea virus in persistently infected cattle*, Vet Microbiol 50,1-6.

Brock KV, Grooms DL, Ridpath J and Bolin SR (1998) *Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus*, J Vet Diagn Invest 10 (1), 22-26.

Brock KV, Ridpath JF and Deng R (1993) Comparative hybridization and nucleotide sequence information from two noncytopathic isolates of bovine viral diarrhea virus, Vet Microbiol 36, 69-82.

Brown TT, Schultz RD, Duncan JR and Bistner SI (1979) Serological response of the bovine fetus to bovine viral diarrhea virus, Infection and Immunity 25 (1), 93-97.

Brownlie J (1990) Pathogenesis of mucosal disease and moleküler aspects of bovine virus diarrhoea virus. Vet Microbiol 23, 371-382.

Brownlie J, Clarke MC and Howard CJ (1989) *Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhea virus*, Res Vet Sci 46, 307-311.

Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ and Pocock DH (1986) The development of disease following infection of cattle with non-cytopathic and cytopathic bovine virus diarrhea virus: 9th International Symposium of the World Association of Veterinary microbiologists, immunologists and specialists in infectious diseases (W.A.V.M.I.) Oct. 8-11, Paraguay.

Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ and Pocock DH (1987) Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhea virus infection of cattle, Ann Rech Vet
18:157-166.

Brownlie J, Hooper LB, Thampson I and Collins ME (1998) *Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhea virus (BVDV) the bovine pestivirus.* Clin Diagn Virol 10(2-3), 141-150.

Bruschke CJ, Haghparast A, Hoek A, Rutten V, Wentink GH, Rijn PA and Oirschot JT (1998) The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semi-homologous cytopathic BVDV.
Vet Immunol Immunopathol 62(1), 37-50.

Bruschke CJ, Rijn PA, Moorman RJM and Oirschot JT (1996) Antigenically different pestivirus strains induce congenital infection in sheep: A model for bovine virus diarrhea virus vaccine efficacy studies, Vet Microbiol 50 , 33-34.

Burgu İ and Özkul A (1993) *Detection of bovine virus diarrhoea (BVD) virus following field infections in cattle and their fetuses in Turkey*, Dtsch. Tierärztl Wschr, 100, 361-363

Burgu İ, Öztürk F, Akça Y, Toker A, Frey HR and Liess B (1990) *Türkiye'de koyunlarda bovine viral diarrhea (BVD) enfeksiyonlarının varlığı ve önemi*, A.Ü.Vet. Fak. Derg 37(1), 121-127.

Campen H, Williams ES, Edwards J, Cook W and Stout G (1997) *Experimental infection of deer with bovine viral diarrhea virus*, J Wild Life Dis 33 (3), 567-573.

Carlsson V (1991) *Border diseases in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhea virus*, Vet Rec 128, 145-147.

Carman S, Dreumel T, Ridpath J, Hazlett M, Alves D, Dubovi E et al. (1998) *Severe acute bovine viral diarrhea in ontario, 1993-1995*, J Vet Diag Invest 10 (1), 27-35.

Casaro APE, Kendrick JW and Kennedy PC (1971) *Response of bovine fetus to BVD-MD virus*, Am J Vet Res 32 (10), 1534-1562.

Castrucci G, Frigeri F, Ferrari M and Traldi V (1991) *The vaccination and challenge with bovine viral diarrhea virus (BVDV) of calves previously infected with a non-cytopathic BVDV*, Comp Immun Microbiol Inf Dis 14 (1), 31-38.

Castrucci G, Ferrari M, Frigeri F and Traldi V (1994) *Immunosuppression as a factor in allowing mucosal disease to occur*, Comp Immun Microbiol Inf Dis 17 (2), 85-90.

Classick LG and Fernelius AL (1970) *Bovine viral diarrhea virus: Neutralizing antibodies in a calf obtained by cesarean section from cow which was infected*, Am J Vet Res 31 (2) 393-395

Collett MS, Moenning V and Horzinek MC (1989) *Recent advances in pestivirus research: Review Article*, J Gen Virol 70, 253-266.

Corapi WV, Donis RO and Dubovi EJ (1990) *Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhea virus*, Am J Vet Res 51 (9),1388-1394.

Coria MF, Schmerr MJF, Mc Clurkin AW and Bolin SR (1984) *Differentiation of cytopathic and noncytopathic isolates of bovine viral diarrhea virus by virus neutralization*, Am J Vet Res 45 (10), 2129-2131.

Coria MF, Mc Clurkin AW and Bolin SR (1983) *Total protein and immunoglobulins G₁, G₂, and M in serum of calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus*, Am. J. Vet.Res. 44 (10) , 1938-1939.

Coulibaly COZ, Liess B, Trautwein G and Schleuter G (1986) *Quantitative analysis of immunoglobulins G₁ and G₂ in blood Samples of cattle persistently infected with bovine virus diarrhea virus*, Institute of Virology and Institute of Pathology, Hannover Veterinary School, Received for publication February 26.

Cutlip RC, Mc Clurkin AW and Coria MF (1980) *Lesions in clinically healthy cattle persistently infected with the virus of bovine viral diarrhea-glomerulonephritis and encephalitis*, Am J Vet Res 41 (12), 1938-1941.

Darbyshire JH (1962) *Agar gel diffusion studies with a mucosal disease of cattle; I. preliminary results with the technique*, Res Vet Sci 3, 118-128.

Depner K, Hübschle OJ and Liess B (1991) *BVD virus infection in goats-experimental studies on transplacental transmissibility of the virus and its effect on reproduction*, Arch Virol [Suppl 3], 253-256.

Deregt D and Loewen KG (1995) *Bovine viral diarrhea virus: Biotypes and disease*, Can Vet J 36, 371-378.

Deregt D and Prins S (1998) *A monoclonal Antibody-based Immunoperoxidase monolayer (micro-isolation) assay for detection of type 1 and type 2 bovine viral diarrhea virus*, Can Vet Res 62, 152-155.

Diderholm H, Klingeborn B and Dinter Z (1974) *A hazy ("Bull's Eye") plaque variant of bovine viral diarrhea virus*, Archiv für die gesamte Virusforschung 45, 169-172.

Done JT, Terlecki S, Richardson C, Harkness JW, Sands JJ, Patterson DSP et al (1980) *Bovine virus diarrhea-mucosal disease virus: Pathogenicity for the fetal calf following maternal infection*, Vet Rec 7, 473-479.

Duffell SJ and Harkness JW (1985) *Bovine virus diarrhea-mucosal disease infection in cattle*, Vet Rec 117, 240-245.

Elazhary M, Silim A and Dea S (1984) *Prevalence of antibodies to bovine respiratory syncytial virus, bovine viral diarrhea virus, bovine herpesvirus - 1 and the bovine parainfluenza -3 virus in sheep and goats in Quebec*, Am J Vet Res 45 (8), 1660-1662.

Fernandez A, Hewicker M, Trautwein G, Pohlenz J and Liess B (1989) *Viral antigen distribution in the central nervous system of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus*, Vet Pathol 26, 26-32.

Fernelius AL (1968) *Characterization of bovine viral diarrhea viruses II. ultrafiltration properties of different strains after various treatments*, Archiv für die gesamte virusforschung 25, 219-226.

Fernelius AL and Lambert G (1969) *Detection of bovine viral diarrhea virus and antigen in tissues of experimentally infected calves by cell inoculation and fluorescent antibody techniques*, Am J Vet Res 30 (9), 1551-1559.

Finci E (1972) Türkiye'de mucosal disease (Virusi Diyare) üzerinde araştırmalar, A. Ü Vet Fak Doçentlik Tezi, Ankara.

Fredriksen B, Odegaard SA and Loken T (1998) *The effect of bovine virus diarrhoea virus on reproduction in recently infected Norwegian dairy herds*, Acta Vet Scand 39 (1), 99-108.

Frey HR, Depner KR, Gelfert CC and Liess B (1991) *BVD virus isolation techniques for routine use in cattle herds with or without previous BVD history*, Arch Virol [Suppl 3], 257-260.

Frey HR, Depner KR, Gelfert CC und Liess B (1998) *Bovine virus diarrhoe (BVD)-diagnostische ermittlung von rindern mit persistenter BVD -virusinfektion*, Dtsch Tierärztl Wschr, 64-66.

Frey R, Liess B, Peters W, Roming L and Lehmann B (1987) *Aatilogische beziehungen zwischen BVD-Virusinfektionen bei rindem und fällen mit klinischem verdacht auf bovine virusdiarrhoea*, Dtsch Tieräztl Wschr 94, 580-583.

Frey HR and Liess B (1971) *Vermehrungskinetik und verwendbarkeit eines stark zytopatogenen VD-MD-Virusstammes für diagnostische untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode*, Zbl Vet Med 18, 61-71.

Gelferd CG (1991) Epidemiologische untersuchungen über die verbreitung des BVD-virus bei Rindern in der Türkei, Inaugural Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.

Gillespie JH, Bartholomew PT, Thomson RG and Mc Ente K (1967) *The isolation of noncytopathic virus diarrhea virus from two aborted bovine fetuses*, Cornell Vet 57, 564-571.

Greiser-Wilke I, Haas L, Dittmar K, Liess B and Moenning V (1993) *RNA insertions and gene duplications in the nonstructural protein p125 region of pestivirus strains and isolates in vitro and in vivo*, AP Virology , Thu Jan- 21,16,50,51, 1-4.

Gromms DL, Brock KV and Warol LA (1998) *Detection of bovine viral diarrhea virus in the ovaries of catle acutely infected with bovine viral diarrhea virus*. J Vet Diagn Invest 2, 125-129

Gufler H, Pernthaner A, Hofbauer J and Baumgartner W (1997) *Haamorrhagische verlaufsfrom der BVD bei einem kalbhemorrhagic syndrome in a calf infected with bovine diarrhea virus*, Wien Tierärztl Mschr Verlag OSTAG 84, 288-291,Wien.

Gunn HM (1993) Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus, Vet Rec 132, 584-585.

Hafez SM and Liess B (1972) Studies on bovine viral diarrhea-mucosal disease virus II. stability and some physico-chemical properties, Acta Virol 16, 309-408.

Hafez SM, Liess B and Frey HR (1976) Studies on the natural occurrence of neutralizing antibodies against six strains of bovine viral diarrhea virus in field sera of cattle. Zbl Vet Med B 23, 669-677.

Hafez SM, Petzoldt K and Reczko E (1968) Morphology of bovine viral diarrhea virus. Acta Virol 12, 471-473.

Hamers C, Lecomte C, Kulcsar G, Lambot M and Pastoret PP (1998) Persistently infected cattle stabilise bovine viral diarrhea virus leading to herd specific strains, Vet Microbiol 61 (3), 177-182, March-3.

Harkness JW, Sands JJ and Richards MS (1978) Serological studies of mucosal disease virus in England and Wales, Res Vet Sci 24, 98-103.

Hewicker-Trautwein M and Trautwein G (1994) Porencephaly, hydronecephaly and leukoencephalopathy in ovine fetuses following transplacental infection with bovine virus diarrhea virus: distribution of viral antigen and characterization of cellular response, Acta Neuropathol (Berl) 87 (4), 385-397.

Hewicker-Trautwein M, Trautwein G, Frey HR and Liess B (1995) Variation in neuropathogenicity in sheep fetuses transplacentally infected with non-cytopathogenic and cytopathogenic biotypes of bovine virus diarrhea virus, Zbl Vet Med [B] 42 (9), 557-567.

Hewicker-Trautwein M, Trautwein G and Liess B (1995) Brain lesions in calves following transplacental infection with bovine-virus diarrhea virus. Zbl Vet Med [B] 42 (2), 65-77.

Hewicker-Trautwein M, Trautwein G, Moenning V and Liess B (1992) Infection of ovine fetal brain cell cultures with cytopathogenic and non-cytopathogenic bovine viral diarrhea virus, Vet Microbiol 33, 239-248.

Horzinek MC (1990) *Bovine virus diarrhea virus*, Rev Sci Tech Off Int Epiz 9(1),13-23.

Houe H (1995) *Epidemiology of bovine viral diarrhea virus*, Vet Clin North Am Food Anim Pract 11 (3), 521-547.

Houe H and Meyling A (1991) *Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy*, Prev Vet Med 11. 9-16

Howard CJ, Brownlie J and Thomas LH (1986) *Prevalance of bovine virus diarrhea virus viremia in cattle in the U.K.*, Vet Rec 628-629

Howard TH, Bean B, Hillman R and Monke DR (1990) *Surveillance for persistent bovine viral diarrhea virus infection in four artificial insemination centers*, JAVMA 196 (12), 1951-1955.

Hubbert WT, Bryner JH, Fernelius AL, Frank GH and Estes PC (1973) *Viral infection of the bovine fetus and it's environment*, Archiv für gesamte Virusforschung 41, 86-98.

Hyera JMK, Dahle J, Liess B, Moenning V and Frey HR (1985) *Production of potent antisera raised in pigs by anamnestic response and use for direct immunoflourescent and immunoperoxidase techniques*: A seminar in the CEC programme of coordination of research on animal husbandry, held in Brussels, 87 –101, 10-11.

Hyera JMK, Liess B and Frey HR (1987) *A direct neutralizing peroxidase-linked antibody assay for detection and titration of antibodies to bovine viral diarrhoea virus*, J Vet Med B 34, 227-239.

Jensen J, Aiken J and Schultz RD (1990) *Detection of bovine viral diarrhea virus genome in leukocytes from persistently infected cattle by RNA-cDNA hybridization*, Can J Vet Res 54, 256-259.

Jian Xu, Mendez E, Caron P, Chao Lin, Murcko MA, Collet MS et al. (1997) *Bovine viral diarrhea virus N 53 serine proteinase: polyprotein cleavage sites , co factor*

requirements and indeclar model of an enzyme essential for pestivirus replication, J Virol 5312-5322 .

Johnson DW and Muscoplat CC (1973) *Immunologic abnormalities in calves with chronic bovine viral diarrhea*, Am J Vet Res 34 (9), 1139-1141.

Jubb KVF, Kennedy PC and Palme N (1985) Infectious and parasitic diseases: Third edition Vol.2, Academic Press Inc, 95-101, London.

Kaerber G (1964) *In diagnostic procedures for virus and rickettsial disease*, Public Health Assoc 3,48-50.

Kahrs RF, Gibbs EPJ and Larsen RE (1980) *The search for viruses in bovine semen: A review*, Theriogenology 14, 151-165.

Karaoglu MT (1996) *Sahadan izole edilen bovine viral diarrhea virus (BVDV) suşlarının immunoplak test yardımı ile biyotip karakterlerinin (sitopatojen-cp ve sitopatojen olmayan-ncp) saptanması*, A Ü Sağ Bil Enst Doktora Tezi , Ankara.

Kendrick JW (1971) *Bovine viral diarrhea-mucosal disease virus infection in pregnant cows*, Am J Vet Res 32, 533-544.

Kirkland PD, Richards SG, Rothwell JT and Stanley DF (1991) *Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections*, Vet Rec 128, 587-590.

Kobrak A and Weber EL (1997) *Bovine diarrhea virus:an update*, Rev Argent Microbiol, Jan- Mar 29 (1) ,47-61.

Kommisrud E, Vatn T, Lang-Ree JR and Loken T (1996) *Bovine virus diarrhea virus in semen from acutely infected bulls*, Acta Vet Scand 37 (1), 41-47.

Kotwal S and Narayan KG (1985) *Direct immunoperoxidase test in the diagnosis of rabies -an alter- native to flourescent antibody test*, Int J Zoon 12 (1) 80-85

Laamanen UI, Neuvonen EP, Yliviuuhkola EM and Veijalainen PML (1997) *Comparison of RT-PCR assay and virus isolation in cell cultures for the*

detection of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in field samples, Res Vet Sci 63, 199-203.

Larson Bob L (1996) Diagnosing the cause of bovine abortions and other perinatal deaths. food animal practice, finding the cause of bovine perinatal death, 478-486.

Lewis TL, Ridpath JF, Bolin SR and Berry ES (1991) *Detection of BVD viruses using synthetic oligonucleotides*, Arch Virol 117, 269-278.

Liebler EM, Waschbusch J, Pohlenz JF, Moenning V and Liess B (1991) *Distribution of antigen of noncytopathic and cytopathogenic bovine virus diarrhea virus biotypes in the intestinal tract of calves following experimental production of mucosal disease*, Arch Virol [Supple 3], 109-124.

Liebler-Tenorio EM, Greiser-Wilke I and Pohlenz JF (1997) *Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease*, Arch Virol 142, 1613-1634 .

Liess B (1990) *Bovine viral Diarrhea virus*, Virus Infections of Ruminant, 247-266.

Liess B, Frey HR, Orban S and Trautwein G (1987) *Impact of intrauterine bovine viral diarrhea (BVD) virus infection of cattle*, A Ü Vet Fak Derg 34 (3), 555-561.

Liess B, Frey HR, Orban S , Trautwein G,Wiefel W and Blindow H (1984) *Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle*, Zbl Vet Med 31 669-681.

Liess B (1985) *Bedeutung der Immunotoleranz für die Pathogenese der bovinen Virusdiarrhoe*, Aus dem für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover, 420-423.

Loken T, Krogsrud J and Larsen IL (1991) *Pestivirus infections in Norway. Serological investigations in cattle, sheep and pigs*, Acta Vet Scand 32, 27-34.

Lucas MH, Westcott DBF, Edwards S, Newman RH and Swallow C (1986) *Immunofluorescence and cell culture techniques in the diagnosis of viral infection of aborted bovine fetuses*, Vet Rec 118, 242-243.

Magar R, Minocha HC, Montpetit C, Carman PS and Lecomte J (1988) *Typing of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus reference and Canadian field strains using a neutralizing monoclonal antibody*, Can J Vet Res 52, 42-45.

Malmquist WA (1968) *Bovine viral diarrhea-mucosal disease: Etiology, pathogenesis and applied immunity*, JAVMA 152 (6), 763-767.

Mc Clurkin AW, Bolin SR and Coria MF (1985) *Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea*, JAVMA 186 (6), 568-569.

Meyling A (1984) *Detection of BVD virus in viremic cattle by an indirect immunoperoxidase technique*, Recent Advances in virus diagnosis. CEC seminar, Belfast, Sept. 22-23, 37-46

Meyling A and Mikkelsen A (1988) *Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected Bull*, Vet Microbiol 17, 97-105.

Meyling A, Houe H and Jensen AM (1990) *Epidemiologic du virus de la diarrhée virale bovine*, Rev Sci Tech Off Int Epiz 9 (1), 75-93.

Moenning V (1990) Pestiviruses: A review, Vet Microbiol 23, 35-54.

Moenning V, Frey HR, Liebler E, Pohlenz J and Liess B (1990) *Reproduction of mucosal disease with cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus selected in vitro*, Vet Rec 127, 200-203.

Moermann A, Straver PJ, De Jong MCM, Quak J, Baanvanger T and Oirschot JT (1993) *A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle*, Vet Rec 132, 622-626.

Moermann A, Straver PJ, De Jong MC, Quak J, Baanvanger T and Oirschot JT (1994) *Clinical consequences of a bovine virus diarrhea virus infection in a dairy herd: A longitudinal study*, Vet Q 16(2), 115-119

Munoz DP, Lager IA, Mersich S, Zabal O, Ulloa E, Schudel AA et al. (1996) Foetal infections with bovine viral diarrhea virus in Argentina, Br Vet J 152 (2), 175-182 March

Nakajima N, Fukuyoma S, Hirahara T, Takamura K, Okada N, Kawazu K et al.(1993) Induction of mucosal disease in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea-mucosal disease virus, J Vet Med Sci 55 (1), 67-72.

Ohmann HB (1983) Pathogenesis of bovine viral diarrhoea-mucosal disease; distribution and significance of BVDV antigen in diseased calves, Res Vet Sci 34, 5-10

Ohmann HB (1988) BVD virus antigens in tissues of persistently viraemic, clinically normal cattle: Implications for the pathogenesis of clinically fatal disease, Acta Vet Scand 29, 77-84.

Ohmann HB, Ronsholdt L and Bloch B (1987) Demonstration of bovine viral diarrhea virus in peripheral blood mononuclear cells of persistently infected, clinically normal cattle, J Gen Virol 68, 1971-1982.

Oirschot JT (1983) Congenital infections with nonarbo togaviruses, Vet Microbiol 8, 321-361.

Olafson P, Mc Callum AD and Fox FH (1946) An apparently new transmissible disease of cattle, Cornell Vet, 36:205-213

Orban S, Liess B, Hafez SM, Frey HR, Blindow H and Sasse-Patzer B (1983) Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus. I.inoculation of pregnant cows 15 to 90 days before parturition(190th to 256th day of gestation), Zbl Vet Med B 30, 619-634.

Öncül S, Meriç I ve Korkut F (1964) Türkiye'de ilk defa Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü sigırlarında tesbit edilen mucosal disease (Mukoza Hastalığı) 'nın klinik yönü, J Anim Breed Res Inst (Lalahan) 4: 186- 199

Özkul A (1992) Gebe ineklerde ve fötuslarında bovine viral diarrhea –mucosal disease (BVD-MD), A Ü Sağ Bil, Doktora tezi, Ankara.

Palfi V, Houe H and Philipsen J (1993) *Studies on the decline of bovine virus diarrhea virus (BVDV) maternal antibodies and detectability of BVDV in persistently infected calves*, Acta Vet Scand 34,105-107.

Perdrizet JA, Rebhun WC, Dubovi EJ and Donis RO (1987) *Bovine virus diarrhea-clinical syndromes in dairy herds*, Cornell Vet 77,46-74.

Potgieter LND (1997) *Bovine respiratory tract disease caused by bovine viral diarrhea virus*, Vet Clin North Am Food Anim Pract 13 (3),471-481.

Qvist P, Houe H, Aasted B and Meyling A (1991) *Comparison of flow cytometry and virus isolation in cell culture for identification of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus*, J Clin Microbiol 29 (3), 660-661.

Radostits OM and Littlejohns IR (1988) *New concepts in the pathogenesis, diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhea virus*, Can Vet J 29, 513-528.

Ramsey FK and Chivers WH (1953) Mucosal disease of cattle, North Am Vet, 34, 629-633.

Reeth K and Adair B (1997) *Macrophages and respiratory viruses*, Pathol Biol 45 (2), 184-192.

Reinhardt G, Riedmann S, Ernst S, Aguilar M, Enriquez R and Gallardo J (1990) *Seroprevalance of bovine viral diarrhea/mucosal disease in southern Chile*, Prev Vet Med 10, 73-78.

Roeder PL and Harkness JW (1986) *BVD virus infection: Prospects of control*, Vet Rec,143-147.

Roeder PL, Jefrey M and Cranwell MP (1986) *Pestivirus feto-pathogenicity in cattle.changing sequelae with fetal maturatio*, Vet Rec 118, 44-48.

Rokos K, Wang H, Seeger J, Schafer A and Pavli G (1998) *Transport of viruses through fetal membranes: an invitro model of perinatal transmission*, J Med Virol 54 (4), 313-319.

Schultz RD (1973) Developmental aspects of the fetal bovine immun response: A review.
Cornell Vet 63, 507-535

Shimizu M and Satou K (1987) Frequency of persistent infection of cattle with bovine viral diarrhea-mucosal disease virus in epidemic areas, Jpn J Vet Sci 49 (6), 1045-1051.

Straver PJ, Journee DLH and Binkhorst GJ (1983) Neurological disorders, virus persistence and hypomyelination in calves due to intra uterine infections with bovine virus diarrhea virus, II. Virology and Epizootiology, Vet Q 5 (4) 156-164

Şimşek A (1994) Klinik olarak sağlıklı sığır sürülerinde persisten bovine viral diarrhea virus enfeksiyonlarının saptanması ve epizootiyolojik önemi, SÜ Sağ Bil Enst. Doktora Tezi, Konya.

Tarry DW, Bernal L and Edwards S (1991) Transmission of BVDV by blood feeding flies, Vet Rec 128, 82-84.

Taylor LF, Donkersgoed J, Dubovi EJ, Harland RJ, Den Hurk JV, Ribble CS et al. (1995) The prevalence of bovine viral diarrhea virus infection in a population of feedlot calves in Western Canada, Can J Vet Res 59, 87-93.

Taylor LF, Janzen ED, Ellis JA, Den Hurk JV and Word P (1997) Performance, survival, necropsy and virological findings from calves persistently infected with the bovine viral diarrhea virus originating from a single Saskatchewan beef herd. Can Vet J 38 (1), 29-37.

Thur B, Caplazi P, Hilbe M, Zlinsky K, Strasser M, Corboz L et al. (1998) Pestiviruses as causative agent of abortion and perinatal mortality in cattle and sheep in Switzerland, DTW Dtsch Tierärztl wochenschr 105 (4), April, 145-148.

Thur B, Hilbe M, Strasser M and Ehrensperger F (1997) Immunohistochemical diagnosis of pestivirus infection associated with bovine and ovine abortion and perinatal death, Am J Vet Res 58 (12), 1371-1375

Traven M, Alenius S, Fossum C and Larsson B (1991) *Primary bovine viral diarrhoea virus infection in calves following direct contact with a persistently viraemic calf.* J Vet Med B 38, 453-462.

Vilcek S, Nettleton PF, Paton DJ and Belak S (1997) *Molecular characterization of ovine pestiviruses,* J Gen Virol 78, 725-735.

Weiss M, Hertig C, Strasser M, Vogt HR and Peterhans E (1994) *Bovine virus diarrhea/mucosal disease: A review,* Schwerz Arch Tierheilkd 136 (5),173-185.

Wentink GH, Exsel ACA, De Goey I and Lieshout JAH (1991) *Spread of bovine virus diarrhoea virus in a herd of heifer calves,* Vet Q 13 (4), 233-236.

Xue W and Minocha HC (1996) *Identification of bovine viral diarrhea virus receptor in different cell types,* Vet Microbiol 49, 67-79.

9. ÖZGEÇMİŞ

10.5.1968 yılında Konya'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Konya'da tamamladı. 1986 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazanarak 1991 yılında mezun oldu. Sağlık Bilimleri Enstitüsünün açmış olduğu doktora sınavını kazanarak 1992 yılında doktoraya başladı. 1993 yılında Selçuk Üniversitesinin açmış olduğu Araştırma Görevliliği sınavında başarılı olarak , Viroloji Anabilim Dalında görev'e başladı. Halen aynı Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.



10. TEŞEKKÜR

Bu konuyu doktora tezi olarak seçmemde bana yardımcı olan ve çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Feridun ÖZTÜRK'e, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalında bana çalışma olanağı sağlayan sayın hocam Prof. Dr. İbrahim BURGU'ya, laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan Doç. Dr. Aykut ÖZKUL ve Araş. Gör. Çiğdem OĞUZOĞLU'na, yazım aşamasında bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Atilla ŞİMŞEK'e, örneklemelerimde bana yardımcı olan Araş. Gör. Mehmet KALE ve Araş. Gör. Oya LEVENT'e ve yazım boyunca evini ve bilgisayarını kullanmama izin veren fakültemiz öğrencilerinden Orkun TARKUN'a teşekkür ederim.

